

**Klonale Evolution
beim myelodysplastischen Syndrom (MDS) und der
chronischen myelomonozytären Leukämie (CMML)
unter epigenetischer Therapie mit Azacitidin**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae
(Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von **Johanna Speith**
geboren am 22.06.1991 in Höxter

Gutachter:

1. PD Dr. Thomas Ernst, Jena
2. Prof. Dr. Frank-Dietmar Böhmer, Jena
3. Prof. Dr. Michael Lübbert, Freiburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 16.01.2018

Abkürzungsverzeichnis:

AML	Akute myeloische Leukämie
ASXL1	<i>Additional-sex-combs-like-transcriptional-regulator-1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
AVA	<i>Amplicon Variant Analyzer</i>
AZA-001	Therapiestudie mit Azacitidin
BKP	Beckenkammfunktion
bp	Basenpaar
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
CALR	<i>Calreticulin</i>
CBL	<i>Casitas B-Lineage Lymphoma Proto-Oncogene</i>
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
CSF3R	<i>Colony stimulating factor 3 receptor</i>
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V.
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNMT3A	<i>DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha</i>
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i>
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
emPCR	Emulsion-Polymerase-Kettenreaktion
ETV6	<i>Ets variant 6</i>
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
FLT3	<i>Fms-related tyrosine kinase 3</i>
fw	<i>Forward</i>
gDNA	<i>Genomic deoxyribonucleic acid</i>
HCl	Salzsäure
HSC	Hämatopoetische Stammzelle
IDH1	<i>Isocitrat-Dehydrogenase 1</i>
IDH2	<i>Isocitrat-Dehydrogenase 2</i>
IPSS	<i>International Prognostic Scoring System</i>
IPSS-R	<i>Revised International Prognostic Scoring System</i>

JAK2	<i>Janus Kinase 2</i>
KDM6A	<i>Lysine (K)-Specific Demethylase 6A</i>
KIT	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LNK	<i>Lymphocyte-Specific Adapter Protein Lnk</i>
M	Molar
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MDS-EB	<i>MDS with excess blasts</i>
MDS-MLD	<i>MDS with multilineage dysplasia</i>
MDS-SLD	<i>MDS with single lineage dysplasia</i>
MDS-U	MDS unklassifizierbar
MID	<i>Multiplex Identifier</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MPL	Myeloproliferatives-Leukämie-Virus-Onkogen
MPN	Myeloproliferative Neoplasie
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
NOTCH1	<i>Neurogenic locus notch homolog protein 1</i>
NPM1	<i>Nucleophosmin 1</i>
NRAS	<i>Neuroblastom RAS viral onkogen homolog</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	DPBS mit EDTA
PolyPhen-2	<i>Polymorphism Phenotyping v2</i>
PPi	Pyrophosphat
PROVEAN	<i>Protein Variation Effect Analyzer</i>
PTP	PicoTiter Platte
RA	Refraktäre Anämie
RAEB-I	Refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung I
RAEB-II	Refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung II
RARS	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten

RARS-T	Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten und Thrombozytose
RCMD	Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie
RCUD	Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie
RN	Refraktäre Neutropenie
RT	Refraktäre Thrombopenie
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SETBP1	<i>SET-binding protein 1</i>
SF3B1	<i>Splicing factor 3B subunit 1</i>
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SRSF2	<i>Serine/arginine-rich splicing factor 2</i>
STAG2	<i>Stromal antigen 2</i>
TAE-Puffer	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan-Acetat-EDTA Puffer
TET2	<i>TET Methylcytosin-Dioxygenase 2</i>
TP53	Tumorprotein 53
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
U2AF1	<i>U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1</i>
UKJ	Universitätsklinikum Jena
UTX	<i>Ubiquitously Transcribed X Chromosome Tetratricopeptide</i>
V	Volt
VAF	<i>Variant allele fraction</i>
WGA	<i>Whole genome amplification</i>
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WS	Wangenschleimhaut
WT1	<i>Wilms-Tumorsuppressorgen 1</i>
ZRSR2	<i>Zinc finger (CCCH type), RNA-binding motif and serine/arginine rich 2</i>

Inhaltsverzeichnis:

Zusammenfassung.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Myelodysplastische Syndrome	3
1.2 Chronische myelomonozytäre Leukämie	7
1.3 Therapie der MDS- und CMML-Patienten mit Azacitidin (Vidaza®)	8
2 Ziele der Arbeit	11
3 Methodik.....	12
3.1 Patientenkollektiv	12
3.2 Materialien.....	15
3.2.1 Chemikalien	15
3.2.2 Lösungen	16
3.2.2.1 Puffer zur Blutaufbereitung	16
3.2.2.2 Puffer zur Agarose-Gelelektrophorese	16
3.2.2.3 Puffer zur Quantifizierung.....	17
3.2.3 Kitsysteme.....	17
3.2.4 Software	17
3.2.5 Geräte	18
3.2.6 Primer Design.....	18
3.2.7 <i>JAK2</i> V617F Sensitivitätskontrollen.....	19
3.3 Methoden.....	20
3.3.1 Blutaufbereitung.....	20
3.3.2 DNA-Isolierung.....	21
3.3.2.1 DNA-Isolierung aus Leukozytenpellets	21
3.3.2.2 DNA-Isolierung aus Wangenschleimhautabstrichen.....	21
3.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration mittels NanoDrop®.....	22
3.3.4 <i>Whole genome amplification</i> REPLI-g®	22
3.3.5 Genauswahl/ Amplikondesign	23
3.3.6 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)	25
3.3.6.1 <i>Fast Start</i> PCR Protokoll.....	25
3.3.6.2 <i>GC-rich</i> PCR Protokoll	26
3.3.7 Agarose-Gelelektrophorese	27
3.3.8 Aufreinigung der Library	27
3.3.9 Quantifizierung.....	28
3.3.10 Emulsions-PCR.....	28
3.3.11 <i>BeadRecovery</i> und Sequenzierung.....	28

4	Ergebnisse	31
4.1	Technische Auswertungen der Laborarbeit	31
4.1.1	Amplikon-PCR's	31
4.1.2	Sequenzierung	33
4.1.2.1	Coverage aller NGS-Läufe	33
4.1.2.2	<i>JAK2 V617F</i> Sensitivitätskontrollen	35
4.2	Genmutationen	35
4.2.1	Somatische Mutationen	35
4.2.1.1	Somatische Mutationen bei der MDS-Patientenkohorte	37
4.2.1.2	Somatische Mutationen bei der CMML-Patientenkohorte	39
4.2.1.3	Mutationskinetik unter Azacitidin-Therapie	42
4.2.1.3.1	MDS-Kohorte	44
4.2.1.3.2	CMML-Kohorte	45
4.2.2	Einzelnukeotid-Polymorphismen mit möglicherweise pathogener Bedeutung	47
4.2.3	Bekannte Einzelnukeotid-Polymorphismen ohne pathologische Bedeutung ...	47
4.3	Klinische Fälle	48
4.3.1	Klinischer Fall Nr. 1 (Patient #2)	48
4.3.2	Klinischer Fall Nr. 2 (Patient #8)	50
4.3.3	Klinischer Fall Nr. 3 (Patient #11)	52
5	Diskussion	54
6	Schlussfolgerung und Ausblick	59
7	Literaturverzeichnis	60
8	Tabellenverzeichnis	65
9	Abbildungsverzeichnis	66
10	Anhang	67
10.1	Bekannte Einzelnukeotid-Polymorphismen ohne pathologische Bedeutung	67
10.2	Primerliste	81
10.3	Urkunde IZKF-Promotionsstipendium	99
10.4	Danksagung	100
10.5	Ehrenwörtliche Erklärung	101
10.6	Präsentation	102

Zusammenfassung

Myelodysplastische Syndrome (MDS) und myelodysplastisch/myeloproliferative Neoplasien, insbesondere die chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) sind erworbene klonale Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzelle und stellen eine der häufigsten malignen hämatologischen Systemerkrankungen des älteren Menschen dar. Durch den Einsatz moderner Technologien konnten in den vergangenen Jahren zahlreiche neue molekulare Aberrationen beim MDS sowie bei der CMML aufgedeckt werden, welche eine zunehmende Bedeutung im Rahmen der Differenzialdiagnostik, Prognoseabschätzung, Resistenzaufklärung und Therapiewahl erlangen. Bei Hochrisikopatienten, die sich nicht für das Verfahren einer allogenen Stammzelltransplantation qualifizieren, ist die epigenetische Therapie mit Azacitidin (Vidaza®) zugelassen.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit wurden Mutationsanalysen an einer klinisch gut charakterisierten Patientenkohorte (n=15) durchgeführt, davon 10 Patienten mit MDS und 5 Patienten mit CMML. Die gefundenen Mutationen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wurden im klinischen Verlauf unter Therapie mit Azacitidin nachverfolgt, sodass neue Einblicke in die Mutationskinetik der MDS/CMML unter epigenetischer Therapie gewonnen werden konnten. In einem aktuellen Projekt der Arbeitsgruppe wurde eine auf der 454-Technologie basierende *Next-Generation-Sequencing*-Methode (NGS) zum sensitiven und simultanen Nachweis der 25 häufigsten Leukämie-assoziierten Genen in einem einzigen Lauf („Jena-454-Leukämie-Panel“) etabliert (Rinke *et al.* 2013). Inzwischen wurde das Gen-Panel um zusätzliche fünf Gene erweitert.

Insgesamt wurden in 8 von 10 MDS-Patienten sowie in 5 von 5 CMML-Patienten Mutationen nachgewiesen. Sieben von 15 Patienten trugen zwei oder mehr onkogenetische Mutationen. Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wurden 24 Mutationen detektiert. Bei den betroffenen Genen handelte es sich v.a. um epigenetische Regulatorgene *TET2* (n=5), *EZH2* (n=3), *DNMT3A* (n=2), *ASXL1* (n=2), *IDH2* (n=1), Transkriptionsfaktoren *RUNX1* (n=4), *TP53* (n=1), Gene des Spliceosoms *SRSF2* (n=3), *ZRSR2* (n=1) und Gene der Signaltransduktion *KRAS* (n=2). Zum Zeitpunkt des besten Ansprechens unter Azacitidin-Therapie wurden 23 somatische Mutationen identifiziert. Nach Zuordnung der jeweils zusammengehörigen Probenpaare von zwei verschiedenen Zeitpunkten, wurde die Kinetik bei 27 Mutationsverläufen beurteilt. 19/27 Klone

(70%) zeigten eine komplette Stabilisierung der quantitativen Mutationslast, 5/27 Klone (19%) lagen im Verlauf unter der Nachweisbarkeitsgrenze (*KRAS*, n=2; *TP53*, n=1; *ASXL1*, n=1; *SRSF2*, n=1) und 3/27 Klone (11%) nahmen unter der epigenetischen Therapie quantitativ zu (*KRAS*, n=2; *ETV6*, n=1).

Zusammenfassend konnte in der Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass ein gutes Ansprechen auf eine epigenetische Therapie mit Azacitidin bei Patienten mit MDS und CMML in der Mehrzahl der Patienten mit einer klonalen Stabilisierung assoziiert ist und nicht mit einer Eradikation mutierter Subklone.

1 Einleitung

1.1 Myelodysplastische Syndrome

Myelodysplastische Syndrome (MDS) umfassen eine heterogene Gruppe von Stammzellerkrankungen, die neben einer gestörten Proliferation hauptsächlich durch Differenzierungs- und Reifungsstörungen hämatopoetischer Zellen mit Ausbildung von Dysplasien (Tefferi und Vardiman 2009) sowie Veränderungen des Knochenmarkstromas (Germin *et al.* 2013) gekennzeichnet sind. Je nach MDS-Subtyp dominiert im peripheren Blut eine Hypozellularität und im Knochenmark eine Normo- bzw. Hyperzellularität. Mit einer Inzidenz von 30-40/100.000 Einwohnern pro Jahr zählen die MDS zu den häufigsten malignen hämatologischen Erkrankungen, die bevorzugt im höheren Lebensalter auftreten. Durch den demographischen Wandel unserer Gesellschaft nehmen die Inzidenz und somit auch der Stellenwert der Erkrankung im klinischen Alltag stetig zu. Diese Zunahme bei v.a. älteren Menschen beruht wahrscheinlich auf einer mit dem Alter zunehmenden Zahl an somatischen Mutationen in wichtigen Genen der hämatopoetischen Stammzelle (Welch *et al.* 2012). Alle klinischen Symptome der MDS gelten als unspezifisch. Dazu zählen Zeichen einer Anämie, Thrombozytopenie und Granulozytopenie (Gangat *et al.* 2016). Um über die Verdachtsdiagnose hinaus Gewissheit zu erlangen, ist eine Knochenmarkspunktion zur Diagnosestellung erforderlich.

Geläufig ist die Verwendung von MDS im Plural, da sich verschiedene Typen der Erkrankung voneinander abgrenzen lassen. Die Klassifizierung der Subtypen erfolgt anhand zytomorphologischer Kriterien durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO). In **Tabelle 1** ist die WHO-Klassifikation der myelodysplastischen Syndrome aus dem Jahre 2008 dargestellt. Inzwischen wurde diese im Jahre 2016 überarbeitet und hinsichtlich verschiedener Kriterien u.a. der morphologischen Interpretation sowie Zytopenie-Bewertung optimiert. Neben neuen Termini (RCUD = MDSSLD, MDS mit *single lineage dysplasia*; RCMD = MDSMLD, MDS mit *multilineage dysplasia*; RAEB = MDSEB, MDS mit *excess blasts*) wurde die Gruppe der multilineären dysplastischen MDS ohne Blastenvermehrung aber mit Ringsideroblasten und/oder SF3B1 Mutation wieder als eigenständige Entität definiert (ehemals RCMD-RS). Des Weiteren wurde die Gruppe der MDS del(5q) erweitert um jene Patienten, die neben der del(5q)

eine einzelne weitere chromosomale Aberration haben (Arber *et al.* 2016). Diese Arbeit wurde allerdings nach den Kriterien der WHO-Klassifikation aus dem Jahre 2008 durchgeführt.

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Myelodysplastischen Syndrome (2008)

MDS-Subtyp	Knochenmark	Blut
Refraktäre Zytopenie mit unilineärer Dysplasie (RCUD) Refraktäre Anämie (RA) Refraktäre Neutropenie (RN) Refraktäre Thrombopenie (RT)	<5% Blasten, Isolierte Dyserythropoese/ Dysgranulopoese/ Dysthrombozytopoese	<1% Blasten, Uni- oder Bizytopenie
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten (RARS)	<5% Blasten, ≥15% Ringsideroblasten, nur Dyserythropoese	<1% Blasten, Anämie
Refraktäre Zytopenie mit multilineärer Dysplasie (RCMD) mit oder ohne Ringsideroblasten	<5% Blasten, <15% Ringsideroblasten, Dysplasiezeichen in ≥2 Zellreihen (≥10% der Zellen)	<1% Blasten, Bi- oder Panzytopenie
MDS mit isolierter del(5q)	<5% Blasten, isolierte del(5q)	<1% Blasten, Anämie
Refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung I (RAEB I)	5-9% Blasten, Dysplasien keine Auerstäbchen	<5% Blasten, Zytopenien
Refraktäre Anämie mit Blastenvermehrung II (RAEB II)	10-19% Blasten, Dysplasien, evtl. Auerstäbchen	<20% Blasten, Zytopenien, evtl. Auerstäbchen
MDS unklassifizierbar (MDS-U)	<5% Blasten, Dysplasien	<1% Blasten, Zytopenien

Die mediane Überlebenswahrscheinlichkeit liegt bei ca. 30 Monaten. Der alte Begriff der „Präleukämie“ war durch die Erkenntnis geprägt, dass etwa 25% der Patienten eine akute myeloische Leukämie (AML) entwickeln (Thol *et al.* 2015).

Klonale Evolution beim MDS

Aktuelle Studien zeigen, dass vielfältige dynamische Prozesse in der Entwicklung einer hämatopoetischen Erkrankung viele Jahre vor klinischer Manifestation eine Rolle spielen können (Genovese *et al.* 2014; Jaiswal *et al.* 2014; Xie *et al.* 2014). Wie in **Abb. 1** dargestellt, initiieren frühe zyto- und/oder molekulargenetische Aberrationen (*early initiation mutation*) die Umwandlung der normalen Hämatopoese zum MDS und somit zur klonalen Expansion einer hämatopoetischen Stammzelle. Im Falle, dass später eine weitere Mutation (*cooperating mutation*) in den Zellen, die bereits eine frühe Mutation tragen, auftritt, kann es zur

Transformation vom MDS zu einer AML kommen (Xie *et al.* 2014). Welche Faktoren genau den Prozess der klonalen Evolution in Gang setzen, ist noch unzureichend aufgeklärt. Diskutiert werden allerdings dysplastische Veränderungen und eine genetische Instabilität.

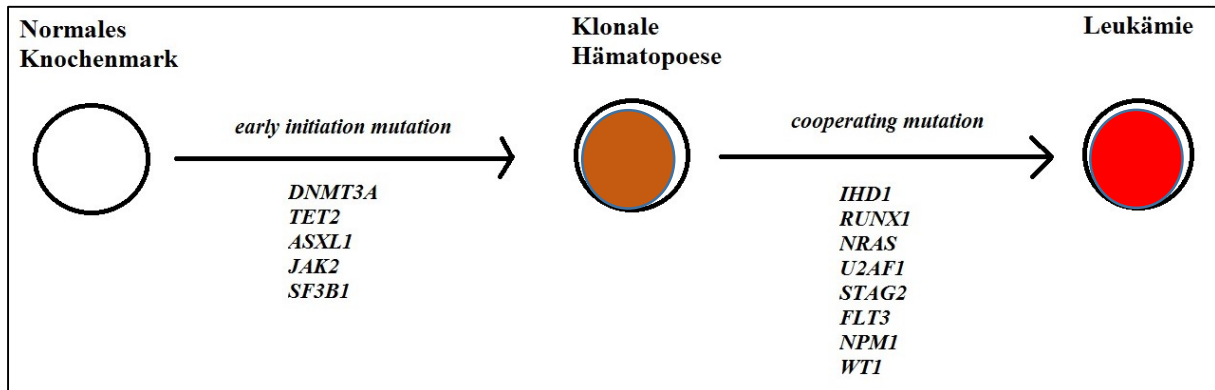


Abbildung 1: Stufenmodell der Leukämiepathogenese. *Early initiation mutation* u.a. in den Genen *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*, *JAK2*, *SF3B1* können eine klonale Expansion der hämatopoetischen Stammzelle bewirken. Eine zusätzliche *cooperating mutation* u.a. in den Genen *IDH1*, *RUNX1*, *NRAS*, *U2AF1*, *STAG2*, *FLT3*, *NPM1* und *WT1* führen zur Transformation in eine Leukämie.

Eine Vielzahl von molekularen Markern erlaubt inzwischen die Diagnose von MDS in Ergänzung zu den etablierten klinischen und zytogenetischen Methoden. Insbesondere bei Patienten mit normalem Karyotyp sind zusätzliche molekulare Analysen hilfreich. Durch den Einsatz von Hochdurchsatztechnologien (z.B. SNP-Arrays) konnten in den vergangenen Jahren auch bei MDS-Patienten mit normalem Karyotyp bisher unsichtbare Veränderungen in der Anzahl der Kopien bestimmter Gene (Verlust oder Zugewinne) sowie Heterozygotie-Verluste (*loss of heterozygosity*, *LOH*) aufgezeigt werden (Mohamedali *et al.* 2007). Die Methode des *Next Generation Sequencing* (NGS) ermöglicht ebenfalls den Nachweis vieler Mutationen beim MDS (Bejar *et al.* 2011; Kulasekararaj *et al.* 2013). Über 90% aller MDS-Patienten tragen mehr als eine Mutation, zwei Drittel davon werden in Individuen mit normalem Karyotyp gefunden (Cazzola *et al.* 2013). Die Veränderungen umfassen Gene aus den Bereichen der Signaltransduktion und Proliferation, der Transkriptionsfaktoren, der epigenetischen Regulation und des RNA-Splicing-Apparates. Am häufigsten betroffen bei letzteren sind *SF3B1* (15-30%), *SRSF2* (10-20%) und *USAFI* (<10%), bei den epigenetischen Regulatoren *TET2* (20-30%), *DNMT3A* (10%), *ASXL1* (15-20%) und *EZH2* (5%) (Cazzola *et al.* 2013). Der Nachweis somatischer Mutationen ist nicht nur für die Diagnostik von erheblicher Bedeutung, sondern spielt auch im Hinblick auf die Risikostratifizierung und den prognostischen Ausblick eine große Rolle. Bei Mutationen in den Genen *TP53*, *ETV6*, *RUNX1*, *ASXL1* und *EZH2* konnte

ein unabhängiger, ungünstiger prognostischer Einfluss festgestellt werden (Bejar *et al.* 2011; Germing *et al.* 2013), v.a. aufgrund des erhöhten Transformationsrisikos in eine AML.

In einer Mutationsanalyse von 439 Patienten mit MDS konnte bei 51% der Patienten mindestens eine molekulare Mutation nachgewiesen werden (Bejar *et al.* 2011). Zudem zeigte sich, dass Patienten mit Mutation häufig mehrere Genmutationen gleichzeitig aufweisen (**Abb. 2**). Inwiefern Chromosomenanomalien einen Einfluss auf die MDS-Pathogenese haben, ist noch weitestgehend ungeklärt. Zugrunde liegt dem Prozess vermutlich eine chromosomale Instabilität des pathologischen Zellklons.

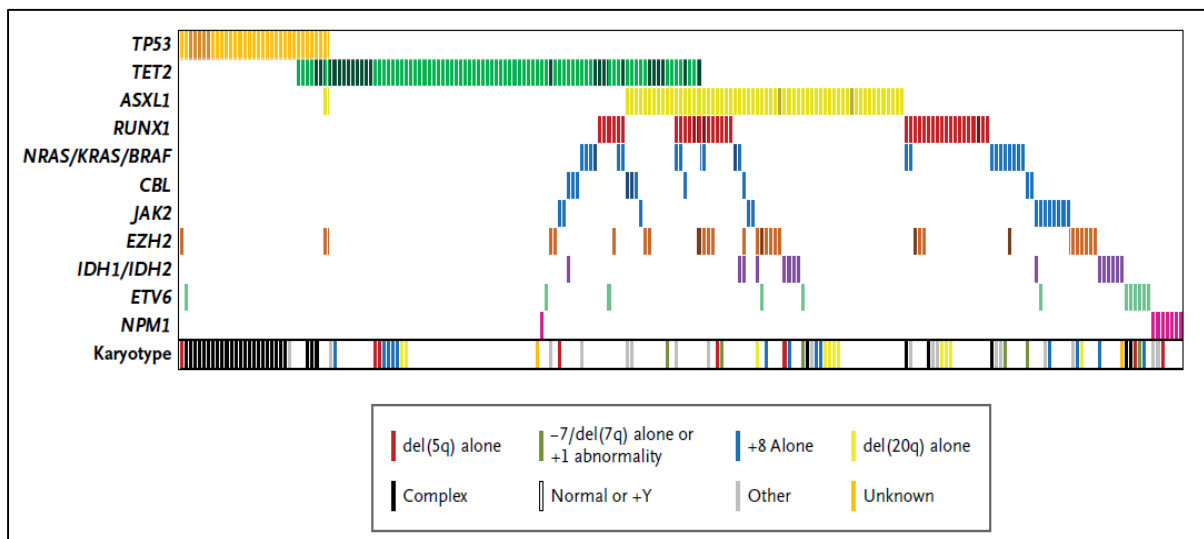


Abbildung 2: Assoziation zwischen zytogenetischen Aberrationen und Genmutationen. Dargestellt wurden 11 der am häufigsten mutierten Gene beim MDS. Auffällig ist, dass Mutationen in *TET2* unverhältnismäßig häufig bei Patienten mit normalen Karyotyp auftreten, sowie *TP53* Mutationen nur bei Patienten mit einem komplexen Karyotyp. (aus Bejar *et al.* 2011)

Ebenfalls hervorzuheben ist die Beziehung zwischen den Mutationen und dem klinischen Phänotyp. Hierbei ist eine *SF3B1*-Mutation häufig mit einer refraktären Anämie mit Ringsideroblasten (RARS) assoziiert (Damm *et al.* 2012). In schwierigen diagnostischen Situationen kann der Nachweis solcher Mutationen die Abgrenzung eines MDS von z.B. sekundären Dysplasien erleichtern (Thol *et al.* 2015).

1.2 Chronische myelomonozytäre Leukämie

Die chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML) gehört mit einer Inzidenz von ca. 1,5/100.000 pro Jahr zu den seltenen Erkrankungen, die vorzugsweise bei älteren Menschen ab 65 Jahren auftritt. Die CMML weist sowohl myelodysplastische als auch myeloproliferative Merkmale auf und wird daher laut WHO Klassifikation 2008 (**Tab. 2**) zusammen mit der refraktären Anämie mit Ringsideroblasten und Thrombozytose (RARS-T) zu den myelodysplastisch/myeloproliferativen Neoplasien zusammengefasst. Viele Experten halten diese Einteilung allerdings für diskutabel und befürworten die ursprüngliche Klassifikation zu den myelodysplastischen Syndromen. Die Unterscheidung in CMML-I bzw. CMML-II ist abhängig vom prozentualen Blastenanteil im Blut und Knochenmark (Itzykson *et al.* 2013).

Tabelle 2: WHO-Klassifikation myelodysplastisch/myeloproliferative Neoplasien (2008)

	Knochenmark	Blut
CMML-I	<10% Blasten, Dysplasien in 1-2 Zellreihen	<5% Blasten, >1000/ μ l Monozyten
CMML-II	<20% Blasten, Dysplasien in 1-2 Zellreihen	<20% Blasten, >1000/ μ l Monozyten
Refraktäre Anämie mit Ringsideroblasten und Thrombozytose (RARS-T)	<5% Blasten, >15% Ringsideroblasten Dysplasien in 1-3 Zellreihen	<1% Blasten, >450.000/ μ l Thrombozyten

Eine ältere Klassifikation, basierend auf der Leukozytenzahl, teilte die CMML ein in einen myelodysplastischen (MDS-CMML; Leukozyten $<13 \times 10^9/l$) oder einen myeloproliferativen Typ (MPN-CMML; Leukozyten $\geq 13 \times 10^9/l$; Bennett *et al.* 1994). Bei den myeloproliferativen Charakteristika der CMML (MPN-CMML) handelt es sich um eine Vermehrung der Monozyten sowie eine Splenomegalie (Germing *et al.* 2013).

Im Jahre 2016 wurde auch die WHO-Klassifikation der myelodysplastischen/myeloproliferativen Neoplasien überarbeitet. Aktuelle Studien zeigten, dass durch die Unterteilung der CMML in 3 Gruppen (**CMML-0** <2% Blasten im Blut, <5% Blasten im Knochenmark; **CMML-1** <5% Blasten im Blut, <10% Blasten im Knochenmark; **CMML-2** <20% Blasten im Blut, <20% Blasten im Knochenmark), entsprechend dem

peripheren und medullären Blastenanteil, eine präzisere Prognose erfolgen konnte (Arber *et al.* 2016).

Bereits in vielen vorausgegangenen Studien konnten multiple somatische Mutationen in CMML-Patienten nachgewiesen werden. In mehr als 80% der CMML-Patienten wurden Genmutationen beschrieben, allerdings sind keine spezifisch für diese Erkrankung (Almeida 2013). *SRSF2*, *TET2*, *ASXL1*, *RUNX1*, *SETBP1*, *KRAS*, *EZH2*, *CBL* und *NRAS* gehören zu den Genen, die in $\geq 10\%$ an CMML erkrankten Patienten als mutiert detektiert wurden (Mason *et al.* 2015).

1.3 Therapie der MDS- und CMML-Patienten mit Azacitidin (Vidaza®)

Die Therapie der MDS/CMML erfolgt individuell risikoadaptiert nach exakter Diagnose und Prognoseabschätzung. Um das individuelle Risiko eines Patienten einzuschätzen, stehen zwei validierte Prognosesysteme (IPSS und IPSS-R) zur Verfügung (Greenberg *et al.* 2012). Berücksichtigt wird in der aktuellen Version des *International Prognostic Scoring System* (IPSS-R) der Karyotyp, der Blastenanteil im Knochenmark sowie die Anzahl der Zytopenien. Somit ist die Zuordnung der Patienten in unterschiedliche Risikogruppen möglich, wodurch die Therapieplanung erheblich beeinflusst werden kann.

Wichtig für die Behandlung ist die Erkenntnis, dass bei beiden Erkrankungen DNA-Hypermethylierungen in Genpromotoren gefunden wurden (Perez *et al.* 2012), wodurch der Einsatz von hypomethylierenden Medikamenten eine bedeutende Rolle spielt. Azacitidin, chemisch 5-Azacitidin (Handelsname: Vidaza®) ist ein Pyrimidin-Analogon (**Abb. 3**), das anstelle von Cytosin in die DNA eingebaut wird und eine direkte zytotoxische Wirkung auf proliferierende Zellen hat. Zusätzlich verhindert es über eine epigenetische Wirkkomponente die Methylierung von cytosin-phosphatidyl-guaninreichen Sequenzen (sog. CpG-Inseln) in den Promotorregionen der DNA, indem das Enzym DNA-Methyltransferase (DNMT) irreversibel gebunden und damit gehemmt wird. Mithilfe von Azacitidin kann somit die Inaktivierung von Genen wieder aufgehoben werden.

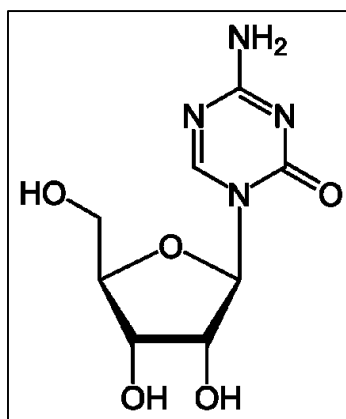


Abbildung 3: Strukturformel von Azacitidin (<http://www.pharmazeutische-zeitung.de>)

Bereits im Jahre 2002 konnte eine signifikante Verlängerung des Überlebens sowie eine verzögerte Transformation zur AML im Vergleich zur besten supportiven Therapie für Patienten mit MDS nachgewiesen werden (Silverman *et al.* 2002). In dieser randomisierten Studie wurde Azacitidin subkutan mit einer Dosis von 75 mg/m² über 7 Tage verabreicht. Im Rahmen der AZA-001-Studie wurde der signifikante Überlebensvorteil um 9,5 Monate gegenüber den drei Therapiealternativen bestmögliche supportive Therapie, niedrig dosiertes Cytarabin und intensiviert Chemotherapie bei allen MDS-Patienten-Subgruppen bestätigt (Fenaux *et al.* 2009). Die größte Studie mit 76 CMML-Patienten unter Azacitidintherapie zeigte ein Ansprechen von 43% (komplette Remission bei 17%) und ein medianes Überleben von 29 Monaten (Ades *et al.* 2013).

Nach Auswertung der AZA-001-Studie wurde das Medikament 2009 durch die Europäische Union für folgende Patienten, die nicht für eine allogene Stammzelltransplantation in Frage kommen, zugelassen (Fachinformation, Celgene 2009):

- **Myelodysplastische Syndrome (MDS)** mit intermediärem Risiko 2 (int-2) oder hohem Risiko (high-risk) nach *International Prognostic Scoring System* (IPSS)
- **Chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML-II)** mit 10-29% Blasten ohne myeloproliferative Störung
- **Akute myeloische Leukämie (AML)** mit 20-30% Blasten und Mehrlinien-Dysplasie gemäß WHO-Klassifikation

Seit November 2015 ist Azacitidin auch zur Behandlung erwachsener Patienten im Alter von mindestens 65 Jahren mit akuter myeloischer Leukämie (AML) und >30% Blasten erlaubt

(Dombret *et al.* 2015). Die Definition eines Hochrisiko MDS-Patienten wird durch morphologische Kriterien der FAB und WHO definiert (Bernal *et al.* 2015).

Azacitidin wird grundsätzlich im Zuge eines 28-Tage-Zyklus an den Tagen 1-7 subkutan (s.c.) appliziert. Die klassische Therapiedosierung liegt bei 75mg/m². Ein möglicher Therapieablauf von Azacitidin ist in **Abbildung 4** skizziert. Aufgrund des epigenetischen Wirkmechanismus setzt der Behandlungserfolg häufig erst nach 4-8 Therapiezyklen ein. Azacitidin wird insgesamt als gut verträglich eingestuft und kann ambulant injiziert werden.

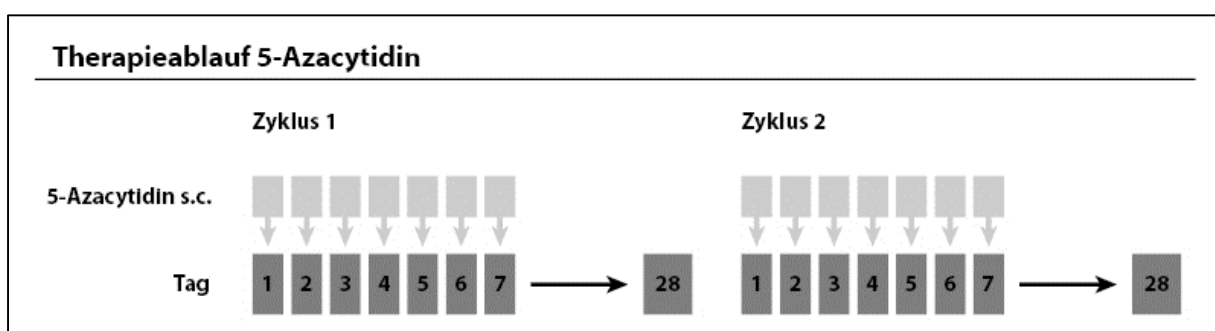


Abbildung 4: Applikationsschema für 5-Azacitidin. Grundsätzlich handelt es sich um 28-Tage-Zyklen. 5-Azacitidin wird an den Tagen 1-7 gegeben. (III. Medizinische Klinik Hämatologie und Onkologie Universitätsmedizin Mannheim; MDS-Exzellenzzentrum)

2 Ziele der Arbeit

Nach aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Hämatologie und Medizinische Onkologie e.V. (DGHO) erhalten alle MDS-Hochrisikopatienten sowie Patienten mit einer CMML und einer Leukozytenzahl $<13 \times 10^9/l$, die nicht für eine allogene Stammzelltransplantation geeignet sind, Azacitidin (Hofmann *et al.* 2013). Aufgrund weniger Therapiealternativen ermöglicht der Einsatz von demethylierenden Substanzen wie z.B. Azacitidin für einen großen Anteil der älteren Patienten die Chance auf einen Behandlungserfolg bzgl. einer Verbesserung der Lebensqualität und Verlängerung des Überlebens, trotz des hohen Mortalitätsrisikos der Erkrankungen. Welche Patienten von der epigenetischen Therapie mit Azacitidin profitieren, kann gegenwärtig nicht vorhergesagt werden, da der Wirkmechanismus noch unzureichend aufgeklärt ist. Im Rahmen der Promotionsarbeit soll die Kinetik und Evolution von molekularen Mutationen bei Patienten mit MDS und CMML im Krankheitsverlauf unter Azacitidin-Therapie näher untersucht werden. Hierbei könnten wichtige Erkenntnisse zur molekularen Wirkung von Azacitidin gewonnen werden.

Hypothese

Der Krankheitsverlauf von MDS- und CMML-Patienten unter Azacitidin-Therapie ist mit einer Veränderung der molekulargenetischen Architektur assoziiert.

Die Hypothese wurde anhand folgender Fragestellungen überprüft:

- 1 Welche Mutationen können bei MDS- und CMML-Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nachgewiesen werden?
- 2 Welche Mutationen können im weiteren Krankheitsverlauf unter Azacitidin-Therapie detektiert werden?
- 3 Wie verhält sich die Mutationskinetik zur Erstdiagnose im Vergleich zum besten molekularen Therapieansprechen unter Azacitidin?

3 Methodik

3.1 Patientenkollektiv

Genehmigungspflichtige Untersuchungen

Ein Ethikvotum zur Asservierung und wissenschaftlichen Analyse von Blut- und Knochenmarkproben liegt in der Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie der Klinik für Innere Medizin II am Universitätsklinikum Jena vor. Alle untersuchten Patienten gaben nach umfassender Aufklärung vor der Entnahme von Blut und/oder Knochenmark ihr schriftliches Einverständnis zu wissenschaftlichen Untersuchungen. Die Analysen erfolgten nach Pseudoanonymisierung der Proben. Der Datenschutz aller Patienten war gewährleistet.

Probenauswahl

Die Leukozyten-DNA wurde aus peripherem Blut oder Knochenmark von 15 klinisch gut charakterisierten Patienten mit MDS (n=10) und CMML (n=5) zu zwei Zeitpunkten der Erkrankung isoliert ($\Sigma=30$ DNA-Patienten-Proben). Bei der ersten Probe handelte es sich jeweils um den Zeitpunkt der Erstdiagnose vor Therapiebeginn. Nach Einleitung der epigenetischen Therapie mit Azacitidin wurde eine zweite Probe des jeweiligen Patienten zum Zeitpunkt des besten Therapieansprechens (Verlaufspröbe) untersucht. Somit konnte einerseits die Prävalenz von Mutationen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose analysiert werden, sowie andererseits die Kinetik der gefundenen Mutationen im weiteren Krankheitsverlauf unter epigenetischer Therapie mit Azacitidin. Außerdem konnten neue, erst im Therapieverlauf entstandene Mutationen detektiert werden. Die Probengewinnung erfolgte im Rahmen einer diagnostisch indizierten Beckenkammpröktion (BKP) in der oben genannten Abteilung.

Nachfolgend sind die Patientencharakteristika in **Tabelle 3** hinsichtlich Alter, Geschlecht und Karyotyp zum Zeitpunkt der Erstdiagnose aufgeführt. **Tabelle 4** zeigt anschließend das Datum der Pröbe, die Proben ID, die Blastenzahl zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sowie das Datum der epigenetischen Therapieeinleitung mit Azacitidin. Des Weiteren finden sich in dieser Tabelle Informationen zur Verlaufspröbe bezüglich des besten Ansprechens (Therapiezyklus), Pröbendatum, Proben ID und Blastenzahl.

Tabelle 3: Patientenkohorte: Demographische Kriterien

Patient	Geschlecht	Alter	Geburtsdatum	Karyotyp	Erstdiagnose
1	W	74	20.12.1936	46,XX,del(20)	MDS-RAEB-II
2	W	72	21.10.1941	Komplex	MDS-RAEB-II
3	W	75	23.07.1938	46,XX	MDS-RAEB-II
4	W	62	08.07.1952	46,XX	MDS-RAEB-I
5	M	64	06.07.1949	46,XY	MDS-RAEB-II
6	W	48	21.01.1966	45,XX,-7[12]/46,XX[7]	MDS-RAEB-II
7	M	73	31.03.1940	46,XY,ider(20)(q10)del(q11q13)	MDS-RAEB-I
8	M	64	23.05.1949	46,XY	MDS-RAEB-I
9	M	61	21.05.1950	46,XY	MDS-RAEB-II
10	M	57	18.07.1956	46,XY	MDS-RAEB-II
11	W	54	31.01.1960	45,XX,-7[11]/46,XX[3]	CMML-II
12	M	62	14.02.1952	46,XY	CMML-II
13	M	63	15.07.1951	46,XY	CMML-II
14	M	70	23.07.1944	46,XY	CMML-I
15	M	63	23.02.1951	46,XY	CMML-II

Tabelle 4: Probenauswahl n=30 \pm 10 MDS- und 5 CMML- Patienten im Therapieverlauf: Datum, Proben ID und Blastenanteil zum Zeitpunkt der Erstdiagnose sowie zum Zeitpunkt des besten Ansprechens unter Azacitidin-Therapie (Therapiezyklus)

Patient	Zeitpunkt 1: <u>Erstdiagnose</u>				Zeitpunkt 2: <u>Verlaufskontrolle</u>			
	Datum	Proben ID	Blastenanteil (%)	Azacitidin-Start	Therapiezyklus Vidaza® (bestes Ansprechen)	Datum	Proben ID	Blastenanteil (%)
1	19.08.2010	10-167	14	23.10.2010	Z.n. 11 Kursen	22.09.2011	11-610	6
2	10.01.2013	33056681	45	16.01.2013	Z.n. 7 Kursen	08.08.2013	33433770	2
3	08.08.2013	33433638	9	13.08.2013	Z.n. 3 Kursen	07.11.2013	33596022	5
4	03.01.2014	33697558	7	08.01.2014	Z.n. 8 Kursen	08.10.2014	34153263	6
5	26.11.2013	33703452	15	27.01.2014	Z.n. 8 Kursen	19.08.2014	34098283	4
6	29.04.2014	33917287	16	08.05.2014	Z.n. 3 Kursen	06.08.2014	13075164	<5%
7	09.07.2013	33379468	5	19.09.2013	Z.n. 2 Kursen	09.04.2014	33880449	4
8	22.04.2013	33239338	8	06.05.2013	Z.n. 3 Kursen	14.08.2013	33403660	1
9	30.11.2011	11-795	21	05.01.2012	Z.n. 4 Kursen	30.04.2012	12-325	9
10	22.05.2013	33293192	14	01.06.2013	Z.n. 3 Kursen	09.10.2013	33511940	10
11	19.02.2014	13060670	17	10.03.2014	Z.n. 7 Kursen	30.09.2014	34191665	12
12	25.07.2014	13074281	24	09.08.2014	Z.n. 6 Kursen	01.04.2015	34535644	3
13	09.05.2014	33935230	15	15.05.2014	Z.n. 7 Kursen	07.01.2015	34374189	10
14	21.10.2014	34236542	Keine Daten	25.11.2014	Z.n. 3 Kursen	13.04.2015	34554713	2
15	06.11.2014	34266380	4	18.11.2014	Z.n. 5 Kursen	02.03.2015	34478735	3

3.2 Materialien

3.2.1 Chemikalien

Tabelle 5: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
100 bp DNA-Längenstandard	Thermo Fisher (Dreieich, Deutschland)
2-Propanol,	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
96% Ethanol,	J. T. Baker (Deventer, Niederlande)
Agarose	Thermo Fisher (Dreieich, Deutschland)
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Ampuwa [®]	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
Bromphenolblau	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
EDTA	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycerin	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
<i>High purity water Milli-Q</i>	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Isoton [®] II Diluent	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
Kaliumhydrogencarbonat	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Na ₂ -EDTA	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
NaOH pellets [®]	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
PBS	GibcoBRL (Karlsruhe, Deutschland)
SDS	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Tris-HCL	Sigma-Aldrich (München, Deutschland)
Tween [®] 20	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)

3.2.2 Lösungen

3.2.2.1 Puffer zur Blutaufbereitung:

Tabelle 6: Lysepuffer [10x] und PE-Puffer

Lysepuffer [10x]	
	500 ml
Ammoniumchlorid	41,5 g
Kaliumhydrogencarbonat	5,0 g
EDTA	0,179 g
➔ bis auf 500 ml mit Aqua destillata auffüllen ➔ Einsatz zur Erythrozyten-Lyse [1x]	
PE-Puffer	
➔ Zugabe von 2 mM EDTA zu einer PBS-Lösung	

3.2.2.2 Puffer zur Agarose-Gelelektrophorese:

Tabelle 7: TAE-Puffer [50x]

	1000 ml
Tris-Base	242 g
Essigsäure	57,1 ml
EDTA (pH 8,0)	100 ml
➔ bis auf 1000 ml mit Aqua destillata auffüllen ➔ Einsatz zur Gelelektrophorese [1x]	

Tabelle 8: DNA-Ladungspuffer für Gelelektrophorese

	100 ml
10 mM Tris-HCL, pH 8,0	1 ml (Stammlösung 1 M)
1 mM Na ₂ -EDTA	200 µl (Stammlösung 0,5 M)
0,1% SDS	500 µl (Stammlösung 20%)
30% Glycerin	30 ml
0,0025% Bromphenolblau	62,5 µl (Stammlösung 4%)
➔ bis auf 100 ml mit Aqua destillata auffüllen ➔ Einsatz zur Gelelektrophorese [1x]	

3.2.2.3 Puffer zur Quantifizierung:

Tabelle 9: TE-Puffer [1x]

Tris-HCL	10 mM
EDTA (pH 7,5)	1 mM

3.2.3 Kitsysteme

Tabelle 10: Kitsysteme

Anwendung	Material	Hersteller
DNA-Isolation	QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
<i>Whole genome amplification</i>	REPLI-g® Ultra Fast Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PCR	FAST START High Fidelity PCR System, dNTPack 500U GC-Rich PCR System, dNTPack 100U	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Aufreinigung	Agencourt AMPure XP Kit	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Quantifizierung	Quant-IT PicoGreen dsDNA-Assay Kit	Thermo Fisher, Dreieich, Deutschland
454 GS Junior Sequencing	GS Junior Titanium Sequencing Kit GS Junior PicoTiterPlate Kit GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-A) GS Junior Maintenance Kits	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

3.2.4 Software

- GS Amplicon Variant Analyzer Software v. 2.5p1 (Roche Applied Science)
- SeqNext (JSI medical systems)

3.2.5 Geräte

Tabelle 11: Geräte

Gerät	Hersteller
454 Sequencing GS Junior	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
Bio-Rad T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Coulter® Z2	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)
EasyPhor Mini - Kammer	BiocomDirect (Lomond Crescent, England)
Eppendorf centrifuge 5415 D	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf centrifuge 5430	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Easypet	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Mastercycler	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf MixMate	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Gel IX Imager	Intas (Göttingen, Deutschland)
GS Junior Bead Counter	Roche Applied Science (Mannheim, Deutschland)
NanoDrop® ND2000	PEQLAB (Erlangen, Deutschland)
Rotator, SB2 stuart	Bibby Scientific US (Burlington, NJ, U.S.A.)
Tecan infinite F200	Tecan Deutschland GmbH (Männedorf, Deutschland)
ULTRA TURRAX® Tube Drive	IKA® (Staufen, Deutschland)
Vakuumpumpe KNF	KNF Neuberger GmbH (Freiburg, Deutschland)
Vortex-Genie2	Scientific Industries (Bohema, NY, U.S.A.)

3.2.6 Primer Design

Es erfolgte eine Unterteilung in zwei Arten von Primern, hier bezeichnet als Primer A und Primer B. Dadurch wurde eine bi-direktionale Sequenzierung der Ziel-Sequenz von beiden Enden ermöglicht. Jeder Primer setzte sich aus drei festen Anteilen zusammen (**Abb. 5**), der Template-spezifischen-Sequenz, dem TCAG-Schlüssel und der GS Junior Titanium Fusions-Primer-Sequenz.

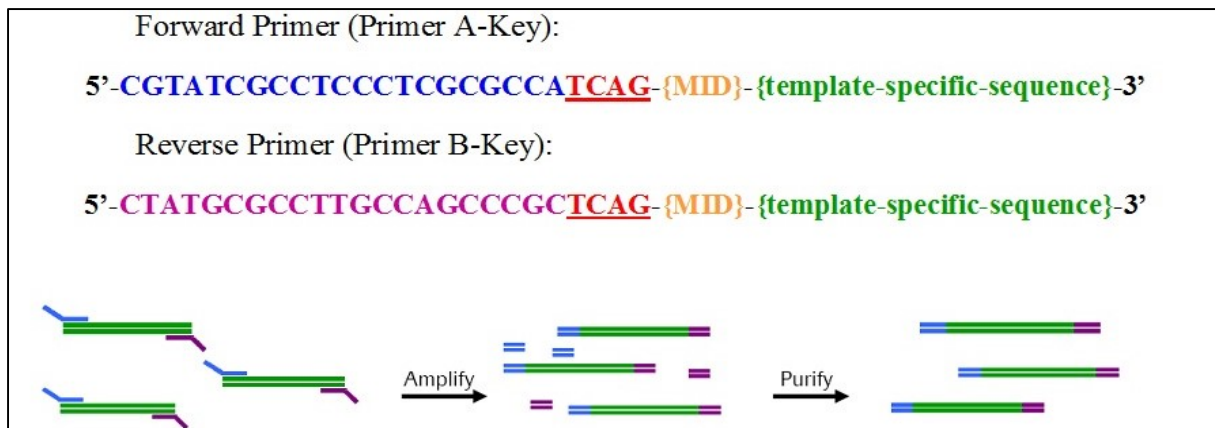


Abbildung 5: Fusionsprimer-Komponenten (Amplicon Library Preparation Method Manual, Roche, 2010)

Bei der zuletzt genannten Nukleotidsequenz am 5'-Ende (in **blau** dargestellt, s. **Abb. 5**) handelte es sich um ein 25-mer. Dieses fungierte v.a. als Adapter während der Emulsions-PCR aber auch bei der Anlagerung der Amplifikations- und Sequenzierungsprimer bei der darauffolgenden *BeadRecovery* und war somit essentiell für die 454 Sequenzierungsmethode. Die darauf folgende TCAG-Sequenz (**rot**) ermöglichte die Identifizierung von DNA-tragenden Beads. Optional konnte zwischen dem Primer A (oder B) und der Template-spezifischen Sequenz ein *multiplex identifier* (MID) (**orange**) hinzugefügt werden. Dieser ermöglichte als DNA-Barcode die automatische Identifikation von Amplikons durch die AVA Software (Roche) nach abgeschlossener Sequenzierung. Die Markierung mit MIDs fand bei jeder Patientenprobe zur Differenzierung der acht unterschiedlichen *JAK2* p.V617F Sensitivitätskontrollen und dem *JAK2* Amplikons sowie zur Verifizierung der gefundenen Mutationen in der REPLI-g®-DNA-Probe Gebrauch.

3.2.7 *JAK2* V617F Sensitivitätskontrollen

Zur Überprüfung der Sensitivität und Qualität wurden in jeder einzelnen NGS (n=30) acht *JAK2* V617F Sensitivitätskontrollen mitgeführt. Diese wiederum wiesen unterschiedliche relative Anteile der *JAK2* V617F Mutation auf (0,1%, 0,5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 50% und 100%). Wild-Typ und mutierte Fragmente wurden mit dem TOPO TA Cloning Kit, Dual Promoter, mit One Shot TOP 10F Chemically Competent *Escherichia coli* (Thermo Fisher Scientific, Dreieich, Deutschland) geklont, gefolgt von einer Plasmid Isolation durchgeführt mit dem Plasmid Maxi Kit (Qiagen) (Schmidt *et al.* 2014).

3.3 Methoden

Zur Untersuchung der Prävalenz von Mutationen sowie der Mutationskinetik im Therapieverlauf sollten 10 MDS- sowie 5 CMML-Patienten zu zwei Zeitpunkten der Erkrankung analysiert werden. Methodisch wurde hierzu das Verfahren des *Next-Generation-Sequencing* (NGS) eingesetzt. Hiermit konnten ca. 35 Mio. Basen pro Sequenzierungslauf analysiert werden. Das Verfahren des (*ultra deep*) *Amplicon Sequencing* ermöglichte die Sequenzierung mit hoher Sensitivität und besteht im Wesentlichen aus folgenden vier Arbeitsschritten:

1. Unter Verwendung genspezifischer Fusionsprimer wurden PCR-Amplikons mit einer Größe von ca. 300-400 bp generiert (*Amplicon Library Preparation*).
2. Die PCR-Amplikons wurden an *Beads* gebunden und mittels Emulsions-PCR klonal amplifiziert (*emPCR Amplification*).
3. Die *Beads* wurden auf eine Picotiter-Platte pipettiert und durch Verwendung eines Pyrosequenzierungs-Verfahrens sequenziert (*Amplicon Sequencing*).
4. Es erfolgte die Datenverarbeitung und –auswertung. Zur Analyse der Daten wird die Software Amplicon Variant Analyzer (Version 2, Roche) und SeqNext (JSI) verwendet.

3.3.1 Blutaufbereitung

Für die Isolierung von Leukozyten wurde die gesamte Blutprobe (7-10 ml) in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und bis 50 ml mit Erythrozytenlysepuffer [1x] aufgefüllt. Die Probe wurde durch gleichmäßiges Schwenken gemischt und anschließend für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde diese für 10 min, 400 x g bei 4°C zentrifugiert, wodurch sich die Leukozyten als Pellet im Reaktionsgefäß absetzen. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen. Im Anschluss daran wurde das Pellet mit 25 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und erneut für 5 min, 400 x g bei 4°C zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde 25 µl PE-Puffer zum Waschen hinzugegeben. Nach der Resuspension wurde die Probe erneut 5 min, 400 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum entfernt und das aufgereinigte Leukozytenpellet in 2 ml PE-Puffer gelöst. Nun wurde die Anzahl an Leukozyten mithilfe des Z2 Coulter Counter® bestimmt. Für die DNA-Isolierung wurden 2×10^7 Zellen in einem 2 ml Mikrozentrifugationstube bei -20°C gelagert.

3.3.2 DNA-Isolierung

Die DNA-Isolierung erfolgte mithilfe des QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) und dem von Qiagen bereitgestellten Protokoll. Dazu wurden die bei der Blutaufarbeitung gewonnenen Leukozytenpellets verwendet. Zur Prüfung, ob es sich bei gefundenen Mutationen um somatische oder hereditäre Mutationen handelte, wurde zusätzlich DNA aus Wangenschleimhaut der Patienten isoliert.

3.3.2.1 DNA-Isolierung aus Leukozytenpellets

Das durch die Blutaufbereitung generierte Leukozytenpellet wurde je nach Leukozytenzellzahl in PBS resuspendiert (1×10^7 Zellen \rightarrow 400 μ l PBS, 2×10^7 Zellen \rightarrow 800 μ l PBS). Anschließend wurde 20 μ l Proteinase K in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 400 μ l der Pellet-PBS-Lösung hinzugegeben. Zusätzlich wurde 200 μ l Puffer AL beigemischt und 15 s gevortext. Folgend inkubierte das Gemisch 10 min bei 56°C im Heizblock, danach erfolgte eine kurze Abzentrifugation, um eine potenzielle Kondensatbildung zu beseitigen. Nach Zugabe von 200 μ l Ethanol (96-100%), einem Pulse-vortex- und Zentrifugationsvorgang wurde der komplette Inhalt des 1,5 ml Mikrozentrifugationstubes auf eine QIAamp Mini *spin* Säule übertragen, ohne den Rand zu benetzen. Nach dem Verschluss des Deckels kam es noch einmal zu einer Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit (full speed, ~ 1 min). Im Anschluss erfolgten weitere Schritte zur Reinigung der adsorbierten DNA mit unterschiedlichen Puffern (AW1 und AW2). Zum Schluss wurde die Probe mit 100 μ l AE Puffer eluiert. Die gewonnene DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.3.2.2 DNA-Isolierung aus Wangenschleimhautabstrichen

Nach der Wangenschleimhautentnahme auf beiden Innenseiten der Mundhöhle des Patienten wurde die DNA aus den gewonnenen Schleimhautzellen isoliert. Dazu wurde der Kopf des Tupfers abgetrennt und in ein 2 ml Mikrozentrifugationstube gegeben zusammen mit 400 μ l PBS. Darüber hinaus wurde 20 μ l Proteinase K und 400 μ l Puffer AL hinzu pipettiert und für 15 sec pulse-gevortext. Das Mikrozentrifugationstube inkubierte nun bei 56°C 10 min auf dem Heizblock und wurde anschließend kurz zentrifugiert. Nach Zugabe von 400 μ l Ethanol (96-100%) wurde das Gemisch erneut gevortext und zentrifugiert. Davon wurden dann 700 μ l auf eine QIAamp *spin* Säule transferiert, die sich wiederum in einem neuen 2 ml Sammel tube befand. Im Anschluss daran erfolgten die Zentrifugationsschritte zur Reinigung der DNA analog zur DNA-Isolierung aus Leukozytenpellets. Die isolierte DNA wurde bei -20°C gelagert.

3.3.3 Bestimmung der DNA-Konzentration mittels NanoDrop®

Um die Konzentration und Qualität der Probe zu ermitteln, wurde das Spektralphotometer NanoDrop 2000 verwendet. Nach Reinigung des Messpults mit Wasser wurde der Leerwert mit 1 µl AE-Puffer ermittelt. Anschließend wurde 1-2 µl der Probe auf das Messpult pipettiert. Mithilfe von elektromagnetischer Strahlung der Wellenlänge 260 nm wurde nun die DNA-Menge detektiert. Zusätzlich misst der NanoDrop 2000 zwei Absorptionskoeffizienten A260/A280 und A260/A230, welche den Reinheitsgrad der DNA beurteilen. Ziel ist es, bei dem ersten Quotienten (A260/A280) Werte um 1,8 sowie beim zweiten Quotienten (A260/A230) Werte zwischen 1,8-2,2 zu erzielen. Bei großen Abweichungen von der vorgegebenen Norm, könnte eine Verunreinigung der Probe vorliegen. Die **Abbildung 6** zeigt schematisch eine DNA-Konzentrationsanalyse mittels Nanodrop-2000.

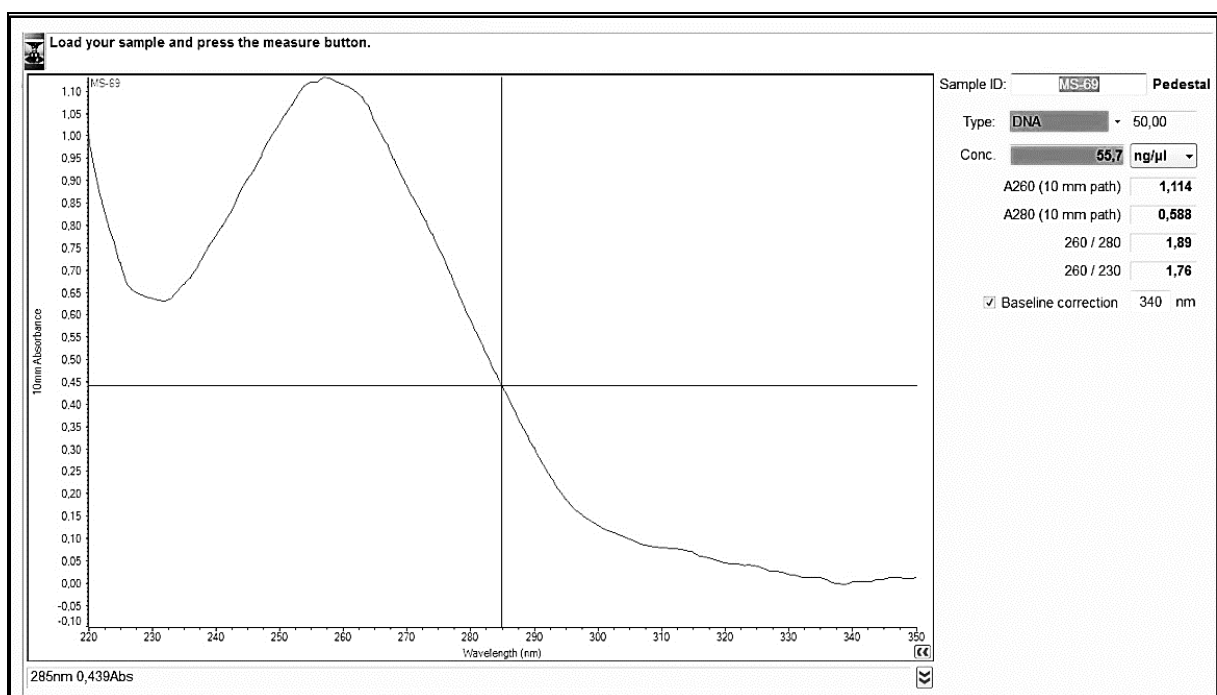


Abbildung 6: Bestimmung einer DNA-Konzentration am NanoDrop® am Beispiel MS-69, Quotient (A260/A280) = 1,9; Quotient (A260/A230) = 1,8

3.3.4 Whole genome amplification REPLI-g®

Da klinisches Probenmaterial häufig limitiert ist, wurde eine lineare DNA-Präamplifikation vorgeschaltet, sodass zur Durchführung der nachfolgenden molekularen Analysen (z.B. PCRs) eine Ausgangsmenge von nur 20 ng/µl genomischer DNA ausreichend war. Zu diesem Zweck

wurde das REPLI-g® UltraFast Mini Kit (Qiagen) verwendet und entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

3.3.5 Genauswahl/ Amplikondesign

Die Amplicon Library („Jena 454 Leukämie Panel“; **Abb.7**) umfasst neben Genen der epigenetischen Regulation (z.B. *TET2*, *ASXL1*, *EZH2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*), wichtige Gene aus den Bereichen der Signaltransduktion und Proliferation (z.B. *FLT3*, *JAK2*, *MPL*, *CBL*), der Transkriptionsfaktoren (z.B. *RUNX1*, *TP53*, *NPM1*), des RNA-Splicing-Apparates (z.B. *SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF35*, *ZRSR2*) und der Zellteilung (z.B. *STAG2*). Beim Design der Amplikons wurden alle Intron-Exon-Übergangsbereiche (**Tab. 12**) erfasst, um auch evtl. Splice-Mutationen zu detektieren (Rinke *et al.* 2013).

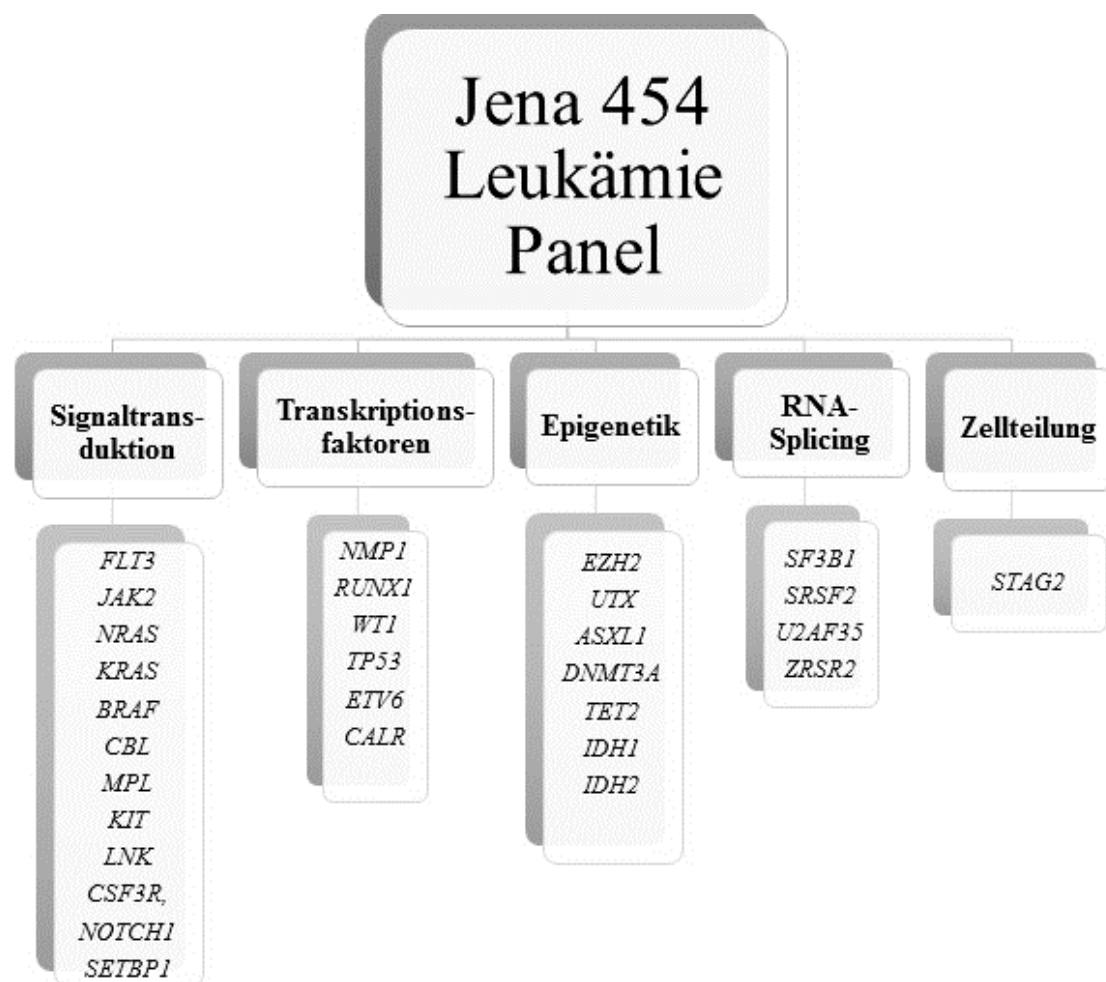


Abbildung 7: „Jena 454 Leukämie Panel“: beinhaltet 30 Leukämie-assoziierte Gene, die für Signaltransduktionsproteine, Transkriptionsfaktoren, epigenetische Regulatoren sowie Komponenten des mRNA-Splittings und der Zellteilung kodieren (nach Rinke *et al.* 2013).

Tabelle 12: Genauswahl mit jeweiligen Exonen

Genfunktion	Gen	Exonauswahl
Signaltransduktion	<i>BRAF</i>	11, 15
	<i>CBL</i>	8, 9
	<i>ETV6</i>	komplett
	<i>FLT3</i>	20
	<i>JAK2</i>	12, 14
	<i>KIT</i>	8, 17
	<i>KRAS</i>	2, 3
	<i>LNK</i>	2
	<i>MPL</i>	10
	<i>NRAS</i>	2, 3
	<i>CSF3R</i>	14,17
	<i>NOTCH1</i>	komplett
	<i>SETBP1</i>	4
Transkription	<i>NPM1</i>	11
	<i>RUNX1</i>	komplett
	<i>TP53</i>	komplett
	<i>WT1</i>	7, 9
	<i>CALR</i>	9
Epigenetik	<i>ASXL1</i>	12
	<i>DNMT3A</i>	komplett
	<i>EZH2</i>	komplett
	<i>IDH1</i>	4
	<i>IDH2</i>	4
	<i>KDM6A</i>	komplett
	<i>TET2</i>	komplett
RNA Splicing	<i>SF3B1</i>	12, 13, 14, 15, 16
	<i>SRSF2</i>	1, 2
	<i>U2AF1</i>	2, 6
	<i>ZRSR2</i>	komplett
Zellteilung	<i>STAG2</i>	komplett

3.3.6 Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

Unter Verwendung genspezifischer Fusionsprimer wurden 232 PCR-Amplikons mit einer Größe von ca. 300-400 bp generiert (*Amplicon Library Preparation*), davon 197 Amplikons mit dem *FastStart High Fidelity PCR System dNTPack Kit* (Roche) und 35 Amplikons mittels *GC-rich PCR System, dNTPack Kit* (Roche Applied Science). Alle PCRs wurden auf Eis vorbereitet und durch Mitführung einer Negativkontrolle auf Kontaminationen kontrolliert.

3.3.6.1 Fast Start PCR Protokoll

PCR-Standardprotokoll:

Tabelle 13: FastStart High Fidelity PCR System Protokoll

Reagenzien	Volumen pro Reaktion [µl]
Molecular Biology Grade Water	17.75
FastStart 10 × Buffer	2.5
dNTP mix [10 mM]	0.5
Forward Primer [6,7 µM]	1.5
Reverse Primer [6,7 µM]	1.5
FastStart HiFi Polymerase [5 U/µl]	0.25
DNA REPLI-g®	1
Total	25

PCR-Programm:

Tabelle 14: FastStart High Fidelity PCR Zyklen

	Zyklen	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	1	10 min	94°C
Denaturierung		1 min	94°C
Annealing	35	1 min	64°C
Elongation		1 min	72°C
Finale Elongation	1	10 min	72°C
Kühlung	1	unbegrenzt	15°C

3.3.6.2 GC-rich PCR Protokoll

PCR-Standardprotokoll:

Tabelle 15: GC-rich PCR System Protokoll

MasterMix Nr. 1		
	0,5 M Resolution Solution	1 M Resolution Solution
Reagenzien	Volumen pro Reaktion [µl]	Volumen pro Reaktion [µl]
Molecular Biology Grade Water	9,5	7
Resolution Solution [5 M]	2,5	5
dNTP [10 mM]	0,5	0,5
Forward Primer [10 µM]	1,5	1,5
Reverse Primer [10 µM]	1,5	1,5
DNA REPLI-g®	2	2
Total	17,5	17,5
MasterMix Nr. 2		
Reagenzien	Volumen pro Reaktion [µl]	Volumen pro Reaktion [µl]
Molecular Biology Grade Water	2	2
5x reaction buffer with DMSO	5	5
Enzym Mix	0,5	0,5
Total	7,5	7,5

PCR-Programm:

Tabelle 16: GC-rich PCR Zyklen

	Zyklen	Zeit	Temperatur
Initiale Denaturierung	1	10 min	94°C
Denaturierung		1 min	94°C
Annealing	45	1 min	60°C
Elongation		1 min	72°C
Finale Elongation	1	10 min	72°C
Kühlung	1	unbegrenzt	15°C

3.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Im Anschluss an die Polymerase-Kettenreaktionen wurde die Größe der entstandenen Produkte durch Vergleich mit DNA-Strängen bekannter Größe (sog. DNA-Standard) bestimmt. Für die Herstellung von 3%-igen 96-Well-Gelen wurde 4,5 g Agarose durch kurzes Aufkochen in 150 ml TAE-Puffer [1x] gelöst und anschließend unter stetigem Schwenken auf ca. 60°C abgekühlt. Nach der Hinzugabe von 0.5 µg/ml Ethidiumbromid wurde das Gel in die vorgesehene Apparatur gegossen, mit einem 96-Well-Kamm versehen und für ca. 20 min bei Raumtemperatur abgekühlt. Das ausgehärtete Gel konnte dann in die Gelkammer gelegt werden. Diese wurde zusätzlich mit ausreichend TAE-Puffer [1x], der als Laufpuffer fungiert, befüllt. Vom PCR Produkt wurde 3 µl mit 5 µl Ladepuffer [5x] gemixt und in die vorgesehenen Geltaschen pipettiert. Als Größenkontrolle wurde ein 100 bp großer DNA-Längenstandard (Invitrogen) in die seitlichen Taschen gegeben. Zur Auftrennung wurde für ca. 15 min eine Spannung von 120 V angelegt, sodass die negativ geladene DNA durch das Gel hindurch zum Pluspol wanderte. Die DNA-Banden wurden dann durch den Gebrauch des Gel IX Imager (Intas) detektiert. Ausschlaggebend für die Visualisierung war Ethidiumbromid, das mit der DNA interkaliert und bei einer Fluoreszenz von 590 nm nach UV-Exposition emittiert wurde.

3.3.8 Aufreinigung der Library

Die **Abbildung 8** verdeutlicht das Prinzip der Aufreinigung von PCR-Produkten mithilfe magnetischer Beads (1) (Agencourt Ampure XP Kit).

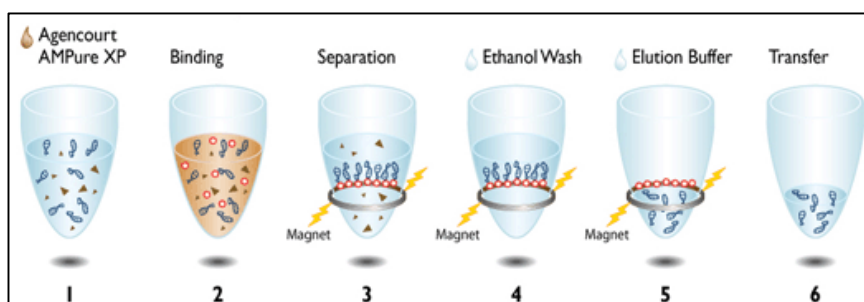


Abbildung 8: Prinzip der Aufreinigung (s. Text) (Agencourt® AMPure® XP Protocol)

Diesbezüglich band die DNA an die magnetischen Beads (2), die sich wiederum unter Verwendung eines 96-well Magnetständers (3) separieren ließen. Durch nachfolgende Waschvorgänge mit 70% Ethanol (4) wurden ungebundene dNTPs, Primer, Primerdimere,

Salze und weitere Rückstände der vorangegangenen PCR entfernt. Nach abschließender Elution (5) mit 15-30 µl TE [1x] je nach Amplikonmenge (siehe **Abb. 11**) wurden die Amplikons >200 bp zurückgewonnen und in eine neue Platte transferiert (6).

3.3.9 Quantifizierung

Der Quant-iT PicoGreen Assay (Invitrogen) nutzte einen ultrasensitiv fluoreszierenden Nukleinsäure Farbstoff zur Quantifizierung doppelsträngiger DNA (dsDNA). Bei diesem Schritt wurde jedes Amplikon separat als 1×10^9 Moleküle/µl in TE-Puffer [1x] verdünnt. Nach der Messung mit dem Tecan infinite F200 bildeten jeweils 10 µl von jedem aufgereinigten und verdünnten Amplikon den sog. Amplikon-Pool.

3.3.10 Emulsions-PCR

Der Amplikon-Pool wurde mit DNA-Capture Beads gemixt (Capture Beads A → Forward Read, Capture Bead B → Reverse Read). Idealerweise bindet ein DNA-Molekül an einen Bead. Während der Emulsions-PCR wurden Millionen von Wasser-in-Öl-Mikroreaktoren generiert, in denen die PCR-Amplikons klonal amplifiziert wurden, sodass 10 Millionen identische Kopien entstanden (**Abb. 9**).

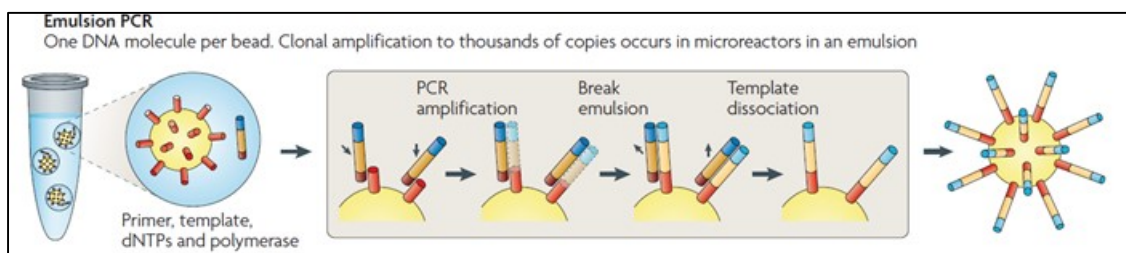


Abbildung 9: Prinzip der emPCR und Generierung von DNA tragenden Beads.
(aus Metzker 2010)

3.3.11 BeadRecovery und Sequenzierung

Zunächst wurden die Capture Beads wiedergewonnen und aufgereinigt. Jene Beads, die keine DNA gebunden hatten, wurden eliminiert. Voraussetzung für die nachfolgende Sequenzierung waren 500 000 bis 2 Millionen DNA-tragende Beads. Die Beads wurden auf eine Picotiter-

Platte pipettiert und durch Verwendung eines Pyrosequenzierungs-Verfahrens sequenziert (Abb. 10).

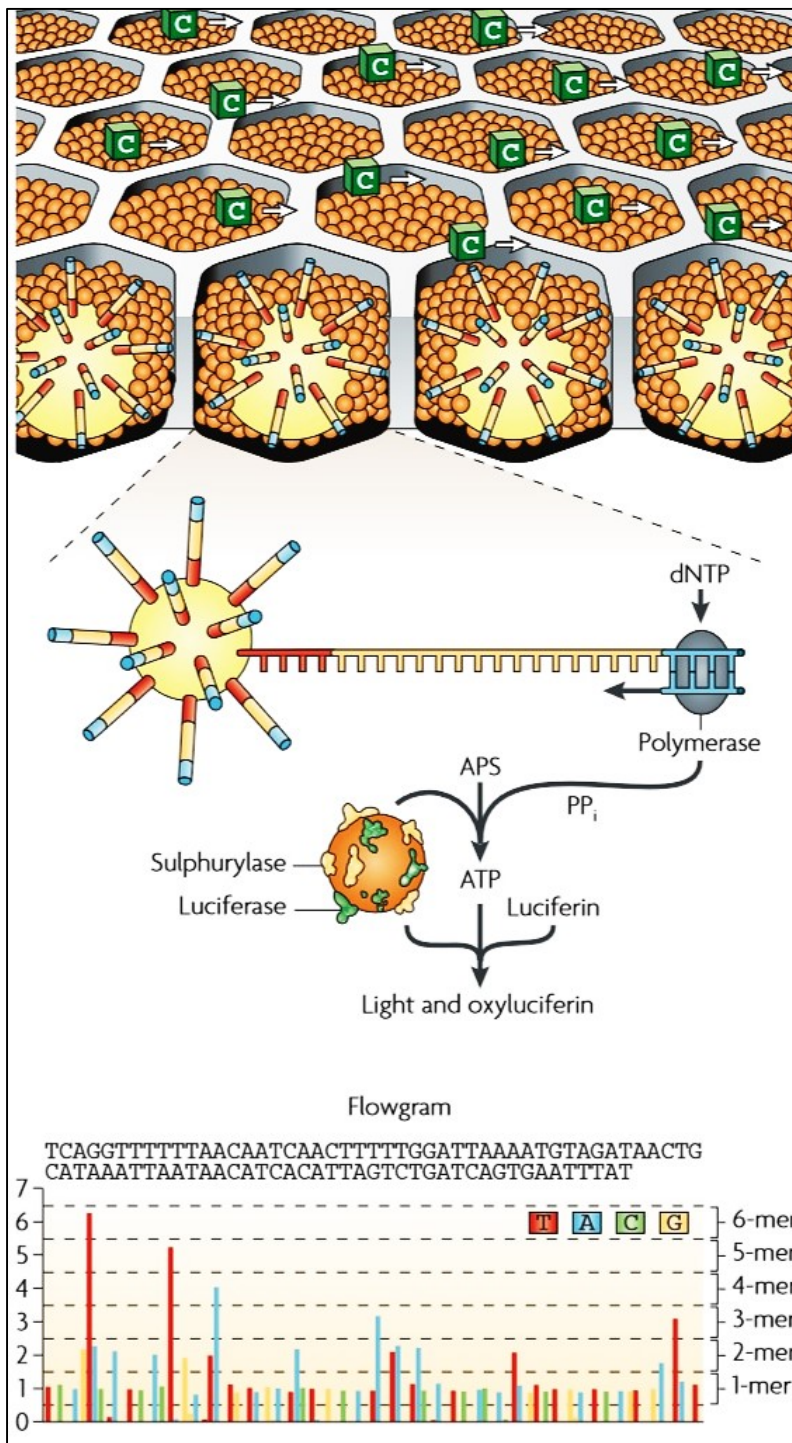


Abbildung 10: Ablauf der 454 Next- Generation-Sequenzierung

DNA-tragende Beads werden zusammen mit Enzym-Beads in die Vertiefungen sog. Mikroreaktionsgefäße der PicoTiter Platte (PTP) geladen. Anschließend strömen dNTPs über die PTP, die durch eine DNA-Polymerase komplementär zum DNA-Template eingebaut werden. Dabei wird Pyrophosphat (PP_i) erzeugt, dass über eine Enzymkaskade Luziferin in Oxyluciferin verwandelt. Das daraus resultierende Lichtsignal wird über eine CCD-Kamera detektiert und als Peak in einem Diagramm „flowgram“ dargestellt.

(aus Metzker 2010)

Eine DNA-Polymerase verlängert ausgehend von dem Annealing-Primer den DNA-Strang komplementär zum Matrizen-Strang durch die sequentielle Zugabe je einer Art von Fluoreszenz-markierten Desoxyribonukleotiden in definierter Reihenfolge. Ist ein Nukleotid

komplementär zur Base im DNA-Template, kommt es zur Freisetzung von Pyrophosphat (PPi), das durch die ATP-Sulfurylase in Adenosintriphosphat (ATP) umgewandelt wird. ATP treibt dann die Reaktion von Luziferin in Oxyluziferin an. Daraus resultiert ein Lichtsignal, das von einer CCD Kamera detektiert wird und dessen Stärke proportional zum verbrauchten ATP ist. Die Reihenfolge und Intensität der Lichtsignale wurde als Peaks im sog. „*flowgram*“ dargestellt, wodurch die zugrundeliegende DNA Sequenz ermittelt werden konnte.

Reads bedeutet, wie häufig ein Amplikon während eines Sequenzierungslaufes gelesen wurde. Als *Coverage* wird die Gesamtheit aller *reads* pro Sequenzierungslauf bezeichnet. Je häufiger ein Amplikon gelesen wurde, desto zuverlässiger und besser ist die Qualität der generierten Daten. Zur Analyse der Daten wurde die Software Amplicon Variant Analyzer (AVA; Roche) und SeqNext (JSI) benutzt. Alle gefundenen Mutationen wurden mit bereits publizierten Daten von Einzelnukleotid-Polymorphismen (*SNP*), abrufbar über den *Ensembl genome browser* (www.ensembl.org), verglichen. Um potentielle Konsequenzen der gefundenen Mutationen abschätzen zu können, wurden zusätzlich zwei weitere offen zugängliche Browser verwendet. Dazu zählt der *Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN)* sowie das *Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2)* (Rinke *et al.* 2013).

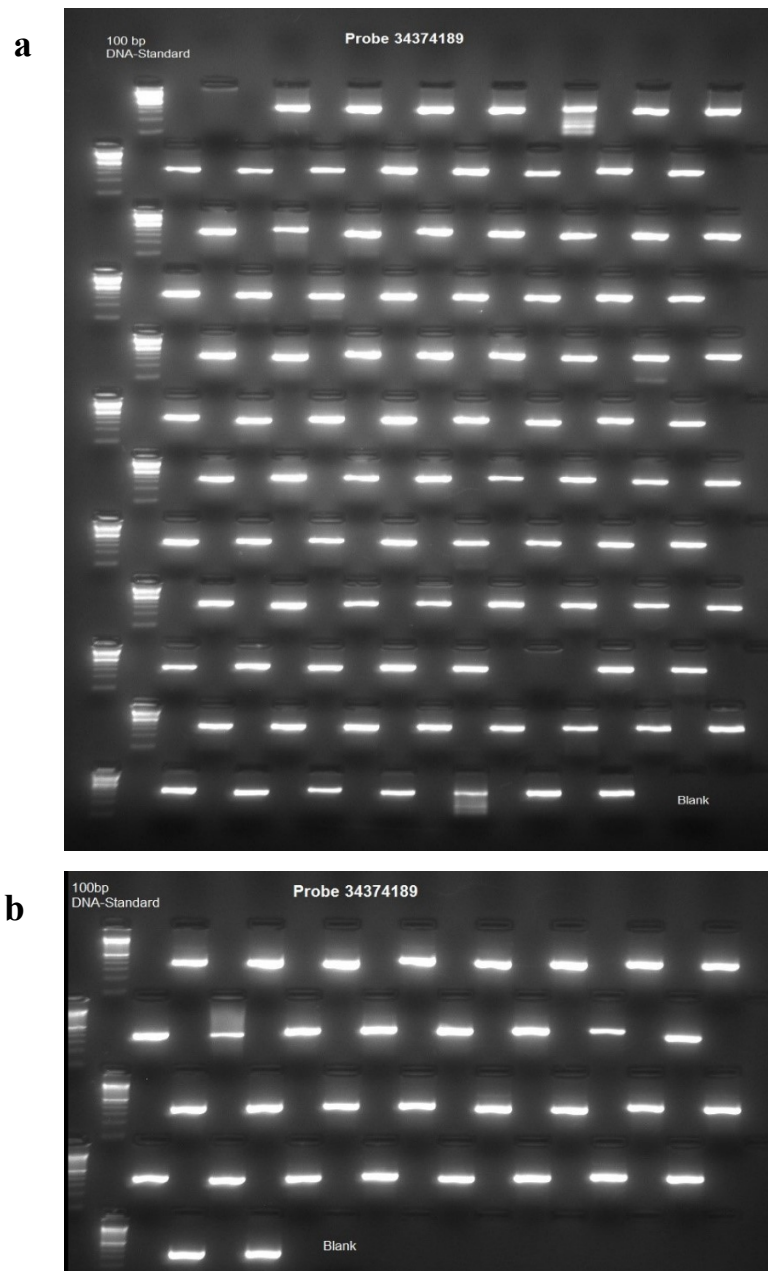
Zusätzlich wurden alle Mutationen, die in der REPLI-g[®]-DNA durch NGS detektiert wurden, an genomischer und Wangenschleimhaut DNA der Patienten zur Qualitätssicherung und Überprüfung des somatischen Ursprungs der Mutation überprüft. Letzteres trifft zu, wenn die Mutation in gDNA/REPLI-g[®]-DNA, aber nicht in der Wangenschleimhaut-DNA gefunden wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Technische Auswertungen der Laborarbeit

4.1.1 Amplikon-PCR's

Die folgenden fünf **Abbildungen 11 a-e** zeigen beispielhaft an Probe 34374189 die 232 PCR-Produkte nach erfolgter Gelelektrophorese. Der 100 bp DNA-Längenstandard (Thermo Fisher) wurde zur Bestimmung der Amplikon-Größe mitgeführt. Ähnliche Ergebnisse wurden für alle weiteren Proben erzielt.



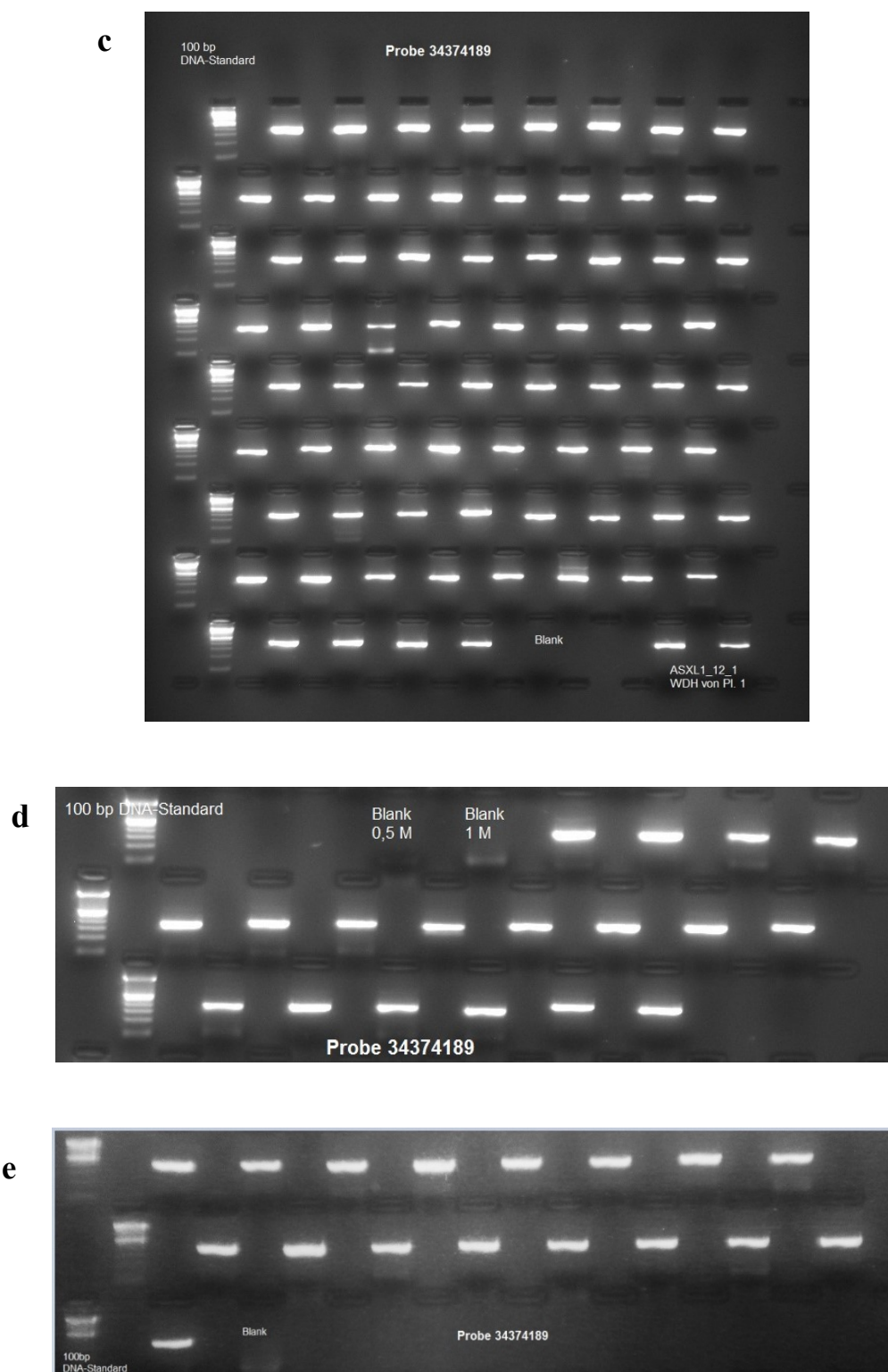


Abbildung 11 (a-e): Agarosegelelektrophorese nach Generierung von 232 Amplikons mittels PCR am Beispiel der Probe Nr. 34374189. Mitführung eines 100 bp großen DNA-Längenstandard (Thermo Fisher) zur Validierung der Amplikongröße. **(a-c)** 197 Amplikons mit dem FastStart High Fidelity PCR System dNTPack Kit und **(d-e)** 35 Amplikons mittels GC-rich PCR System, dNTPack Kit. Alle PCRs wurden durch Mitführung einer Negativkontrolle (Blank) auf Kontaminationen kontrolliert.

4.1.2 Sequenzierung

4.1.2.1 Coverage aller NGS-Läufe

In der nachfolgenden Grafik (**Abb. 12**) wurde die gesamte *Sequencing Coverage* für jeden individuellen NGS Lauf (n=30) dargestellt. Für jede Proben-Identifikationsnummer (x-Achse) kann die Anzahl aller Amplikon *reads* (y-Achse), detektiert mittels Roche 454 GS-Junior, abgelesen werden. Die mediane *Coverage* von allen 30 NGS Läufen beträgt 110,068 *reads*, der Mittelwert liegt bei 111,464 *reads* pro Sequenzierlauf (Spannbreite 68,051 bis 154,061 *reads*).

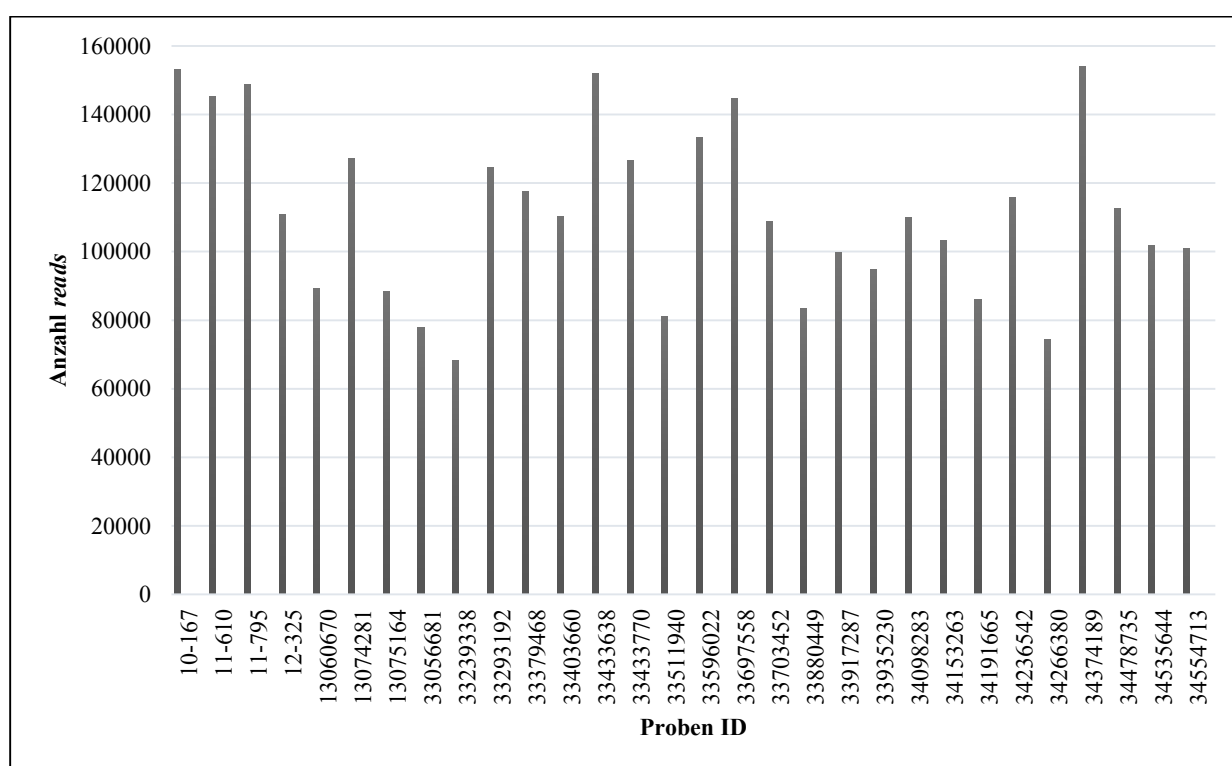


Abbildung 12: *Sequencing Coverage* für alle n=30 Patientenproben

Die **Tabelle 17** zeigt einen Median von 407 *reads* pro Amplikon (Spannbreite 250-581 *reads*). Jedes Amplikon wurde im Mittel 451,7-mal pro Sequenzierlauf vom Roche 454 Junior Gerät analysiert (Spannbreite 277-636). In dieser Rechnung wurden ebenfalls die acht *JAK 2 V617F* Sensitivitätskontrollen berücksichtigt.

Tabelle 17: Median und Mittelwerte der *reads* von allen n=30 NGS

Probe	Median <i>reads</i> (n=30)	Mittelwert <i>reads</i> (n=30)	Spannbreite <i>reads</i>
10-167	568	630	156-2125
11-610	576	599	46-1351
11-795	581	611	189-1269
12-325	415	451	134-1153
13060670	323	357	70-911
13074281	501	523	205-1346
13075164	349	361	118-1876
33056681	302	319	14-947
33239338	250	277	45-836
33293192	433	458	143-1271
33379468	433	484	97-1958
33403660	428	452	98-1657
33433638	309	582	11-13306
33433770	486	520	54-1173
33511940	302	325	28-1330
33596022	473	517	51-1831
33697558	527	592	0-1657
33703452	399	446	77-1153
33880449	330	341	134-1117
33917287	406	410	0-1103
33935230	359	389	198-957
34098283	380	421	77-1085
34153263	374	422	68-1297
34191665	335	349	119-736
34236542	447	479	223-2377
34266380	295	306	103-753
34374189	580	636	123-1664
34478735	449	469	217-1463
34535644	408	413	195-1011
34554713	403	412	172-1195
Total	407	451,7	-

Das Sensitivitätsminimum mit der eine Mutation detektiert werden kann, basiert auf der medianen Amplikon *Coverage* (407 *reads*, n=30 Proben) und ein definiertes Limit von mindestens 25 *Sequencing reads* pro Amplikon.

$$\text{Sensitivitätslevel} = \frac{100\%}{\text{reads pro Amplikon (Median)}} \cdot \text{Minimum reads}$$

$$\text{Sensitivitätslevel} = \frac{100\%}{407} \cdot 25 = 6,1 \%$$

Mit einem cut-off von 25 *reads* pro Amplikon zur Detektion einer echten Mutation und einer medianen *Coverage* von 407 *reads* wurde eine Sensitivitätsgrenze von ca. 6% erzielt.

4.1.2.2 JAK2 V617F Sensitivitätskontrollen

Der nachfolgenden **Tabelle 18** ist der Median und Mittelwert der *reads* von allen acht *JAK2* V617F Sensitivitätskontrollen zu entnehmen. Insgesamt ergibt sich ein Median von 499,5 *reads* sowie ein Mittelwert von 578,9 *reads*.

Tabelle 18: Median und Mittelwert Coverage der 8 JAK2 V617F Sensitivitätskontrollen von allen 30 NGS

Probe	Median reads (n=30)	Mittelwert reads (n=30)
JAK2_0,1%	540	634,4
JAK2_0,5%	500,5	574,1
JAK2_1%	471,5	506,1
JAK2_5%	489,5	621,1
JAK2_10%	679,5	723,1
JAK2_20%	498,5	494,6
JAK2_50%	438	481,2
JAK2_100%	592	596,4
Total (n=8)	499,5	578,9

4.2 Genmutationen

4.2.1 Somatische Mutationen

Insgesamt wurden in 8 von 10 MDS-Patienten sowie in 5 von 5 CMML-Patienten somatische Mutationen detektiert. Des Weiteren wiesen 7 von 15 Patienten ≥ 2 genetische Mutationen auf, davon drei Patienten >2 , weitere drei Patienten >3 und sogar ein Patient >6 Genmutationen gleichzeitig. Diese wurden alle an genomischer DNA (gDNA), isoliert aus Leukozyten und Wangenschleimhaut validiert, um den somatischen Ursprung der Mutationen zu beweisen und Artefakte auszuschließen.

Mutationen in den 30 DNA-Proben

In den 30 Patientenproben wurden insgesamt 47 Mutationen mittels NGS identifiziert. Auffällig war, dass v.a. die epigenetischen Regulatorgene ($\Sigma=25$) *TET2* (n=10), *EZH2* (n=6), *DNMT3A*

(n=4), *ASXL1* (n=3) und *IDH2* (n=2) betroffen waren. Zusätzlich wurden Mutationen in drei Genen im Rahmen der Transkription ($\Sigma=10$) *RUNX1* (n=8), *ETV6* (n=1), *TP53* (n=1) sowie in zwei Spliceosom-Komponenten ($\Sigma=8$) *ZRSR2* (n=2), *SRSF2* (n=6) und einem Gen der Signaltransduktion *KRAS* (n=4) nachgewiesen.

Mutationen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose

Bei den 15 Patientenproben zum Zeitpunkt der Erstdiagnose wurden insgesamt 24 Mutationen nachgewiesen, 13 in der MDS- und 11 in der CMML-Kohorte. Dabei handelt es sich bei der MDS-Kohorte um Veränderungen in *TET2* (n=2), *RUNX1* (n=2), *EZH2* (n=2), *ASXL1*, *TP53*, *DNMT3A*, *IDH2*, *KRAS*, *ZRSR2* und *SRSF2* Genen sowie bei der CMML-Kohorte um *TET2* (n=3), *RUNX1* (n=2), *SRSF2* (n=2), *KRAS* (n=1), *EZH2*, *ASXL1* und *DNMT3A* Genen.

Mutationen zum Zeitpunkt des besten Therapieansprechens unter Vidaza®

Zytomorphologisch konnte bei allen Patienten zum Zeitpunkt der Verlaufskontrolle eine Blastenreduktion im Vergleich zur Erstdiagnose festgestellt werden. Zum Zeitpunkt des besten Ansprechens der Patienten unter Azacitidin-Therapie wurden insgesamt 23 Mutationen gefunden, 11 in der MDS- und 12 in der CMML-Kohorte. Zu den detektierten Genmutationen in der MDS-Kohorte zählten *TET2* (n=2), *RUNX1* (n=2), *EZH2* (n=2), *DNMT3A*, *IDH2*, *KRAS*, *ZRSR2* und *SRSF2* und in der CMML-Kohorte *TET2* (n=3), *RUNX1* (n=2), *SRSF2* (n=2), *KRAS*, *EZH2*, *ASXL*, *ETV6* und *DNMT3A*.

In den nachfolgenden Tabellen sind zunächst die gefundenen somatischen Mutationen der jeweiligen Patientenprobe der MDS- (**Tab. 19**) sowie der CMML-Kohorte (**Tab. 20**) einzeln aufgelistet. Für jedes Gen ist die DNA- und Proteinvariation genannt, die z.T. publizierten Daten des *Ensembl genome browser* und die Einschätzung der *Protein Variation Effect Analyzer (PROVEAN)* sowie das *Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2)* bezüglich der funktionellen Bedeutung der detektierten Veränderung. In den letzten 3 Spalten sind jeweils die Mutationsanteile (in %) in der REPLI-g®, genomischen und der Wangenschleimhaut-DNA angeführt. Die genaue Betrachtung der Mutationskinetik wird detailliert in **Tabelle 21** und **22** aufgegriffen.

4.2.1.1 Somatische Mutationen bei der MDS-Patientenkohorte

Tabelle 19: Zusammenfassung der detektierten Mutationen in den Proben (n=20) der MDS-Kohorte

Probe	Gen	DNA-Variation	Protein-Variation	Ensembl Browser	PolyPhen2 Prognose	PROVEAN Prognose	Mutations-Anteil (%) REPLI-g®	Mutations-Anteil (%) gDNA	Mutations-Anteil (%) WS
10-167	TET2	c.5734C>T	p.H1912Y	∅	vermutlich schädlich	schädlich	22.91	36.42	3.28
11-610	TET2	c.5734C>T	p.H1912Y	∅	vermutlich schädlich	schädlich	36.44	35.06	3.28
33056681	TP53	c.818G>A	p.R273H	Somatische Mutation (COSM99729, COSM10660, COSM1645335), SNP(rs28934576)	vielleicht schädlich	verträglich	43.82	41.80	0.00
33433638	DNMT3A	c.2645G>A	p.R882H	Somatische Mutation (COSM442676, COSM52944), SNP(rs147001633)	vermutlich schädlich	schädlich	30.03	35.81	1.30
	IDH2	c.419G>A	p.R140Q	Somatische Mutation (COSM41590), SNP(rs121913502)	vermutlich schädlich	schädlich	40.50	39.82	0.98
33596022	DNMT3A	c.2645G>A	p.R882H	Somatische Mutation (COSM442676, COSM52944), SNP(rs147001633)	vermutlich schädlich	schädlich	28.88	36.98	1.30
	IDH2	c.419G>A	p.R140Q	Somatische Mutation (COSM41590), SNP(rs121913502)	vermutlich schädlich	schädlich	33.88	34.75	0.98
33697558	ASXL1	c.2449_2450insA	p.T817Nfs*11	Somatische Mutation (COSM97037)			32.51	39.08	0.00

Probe	Gen	DNA-Variation	Protein-Variation	Ensembl Browser	PolyPhen2 Prognose	PROVEAN Prognose	Mutations-Anteil (%) REPLI-g®	Mutations-Anteil (%) gDNA	Mutations-Anteil (%) WS
33703452	TET2	c.3732_3733delCT	p.Y1245Lfs*22	Somatische Mutation (COSM87129)			86.84	85.25	0.74
	ZRSR2	c.115_119delGACTC	p.D39Rfs*14	Ø			89.61	92.46	1.49
34098283	TET2	c.3732_3733delCT	p.Y1245Lfs*22	Somatische Mutation (COSM87129)			23.66	65.15	0.74
	ZRSR2	c.115_119delGACTC	p.D39Rf*14	Ø			43.51	78.90	1.49
33917287	KRAS	c.35G>T	p.G12V	Somatische Mutation (COSM1140133, COSM520), SNP(rs121913529)	vielleicht schädlich	schädlich	15.90	15.43	0.00
33379468	RUNX1	c.922_934del13	p.Q308Cfs*255	Ø			34.96	37.91	6.83
	SRSF2	c.284C>T	p.P95L	Somatische Mutation (COSM211506)	vielleicht schädlich	verträglich	44.22	51.74	6.25
33880449	KRAS	c.37G>T	p.G13C	Somatische Mutation (COSM1152505, COSM527), SNP(rs121913535)	vermutlich schädlich	schädlich	10.50	13.37	0.00
	RUNX1	c.922_934del13	p.Q308Cfs*255	Ø			44.67	48.80	6.38
	SRSF2	c.284C>T	p.P95L	Somatische Mutation (COSM211506)	vielleicht schädlich	verträglich	57.02	51.47	6.25
33239338	EZH2	c.73C>T	p.R25X	Somatische Mutation (COSM53003)			45.88	45.49	0.00
	EZH2	c.1976G>C	p.R659T	Ø	vermutlich schädlich	schädlich	46.13	43.98	0.00
	RUNX1	c.959_960insAAGGTAC	p.M320Ifs*255	Ø			41.15	39.86	0.00

Probe	Gen	DNA-Variation	Protein-Variation	Ensembl Browser	PolyPhen2 Prognose	PROVEAN Prognose	Mutations-Anteil (%) REPLI-g®	Mutations-Anteil (%) gDNA	Mutations-Anteil (%) WS
33403660	EZH2	c.73C>T	p.R25X	Somatische Mutation (COSM53003)			38.79	44.12	0.00
	EZH2	c.1976G>C	p.R659T	Ø	vermutlich schädlich	schädlich	43.39	45.12	0.00
	RUNX1	c.959_960insAAGGTAC	p.M320Ifs*255	Ø			42.54	40.85	0.00

REPLI-g®= REPLI-g® DNA , *whole genome amplified DNA*, **gDNA**=genomische DNA, **WS**= DNA isoliert aus der Wangenschleimhaut, Ø= nicht bezeichnet

4.2.1.2 Somatische Mutationen bei der CMML-Patientenkohorte

Tabelle 20: Zusammenfassung der detektierten Mutationen in den Proben (n=10) der CMML-Kohorte

Probe	Gen	DNA-Variation	Protein-Variation	Ensembl Browser	PolyPhen2 Prognose	PROVEAN Prognose	Mutations-Anteil (%) REPLI-g®	Mutations-Anteil (%) gDNA	Mutations-Anteil (%) WS
34236542	SRSF2	c.284C>A	p.P95H	Somatische Mutation (COSM211505, COSM211504, COSM211028)	vermutlich schädlich	schädlich	44.93	49.40	2.26
	TET2	c.1894C>T	p.Q632X	Somatische Mutation (COSM110758)			84.45	86.31	1.40
34554713	SRSF2	c.284C>A	p.P95H	Somatische Mutation (COSM211505, COSM211504, COSM211028)	vermutlich schädlich	schädlich	39.43	35.22	2.26
	TET2	c.1894C>T	p.Q632X	Somatische Mutation (COSM110758)			67.43	72.35	1.40

Probe	Gen	DNA-Variation	Protein-Variation	Ensembl Browser	PolyPhen2 Prognose	PROVEAN Prognose	Mutations-Anteil (%) REPLI-g®	Mutations-Anteil (%) gDNA	Mutations-Anteil (%) WS
34191665	KRAS	c.173C>T	p.T58I	Somatische Mutation (COSM87288), SNP(rs104894364)	vermutlich schädlich	schädlich	8.55	10.60	1.54
13074281	KRAS	c.38G>A	p.G13D	Somatische Mutation (COSM532, COSM1140132), SNP(rs112445441)	vielleicht schädlich	schädlich	20.09	20.91	0.00
33935230	ASXL1	c.2062C>T	p.R688X	Somatische Mutation (COSM51388, COSM4169684), SNP(rs373221034)			51.63	43.63	4.98
	DNMT3A	c.2318T>A	p.L773H	∅	vermutlich schädlich	schädlich	50.92	47.49	5.79
	EZH2	c.48delG	p.K17Sfs*3	∅			94.14	100.00	0.00
	RUNX1	c.784_785delGG	p.G262Ifs*310	∅			35.26	40.48	3.45
	RUNX1	c.785delG	p.G262Dfs*22	∅			51.28	53.57	7.52
34374189	ASXL1	c.2062C>T	p.R688X	Somatische Mutation (COSM51388, COSM4169684), SNP(rs373221034)			40.79	44.49	4.98
	DNMT3A	c.2318T>A	p.L773H	∅	vermutlich schädlich	schädlich	47.99	44.94	5.79
	ETV6	c.476delA	p.Q159Rfs*50	∅			8.44	6.54	0.00
	EZH2	c.48delG	p.K17Sfs*3	∅			87.99	100.00	0.00
	RUNX1	c.784_785delGG	p.G262Ifs*310	∅			41.15	40.03	3.45
	RUNX1	c.785delG	p.G262Dfs*22	∅			54.19	54.91	7.52

Probe	Gen	DNA-Variation	Protein-Variation	Ensembl Browser	PolyPhen2 Prognose	PROVEAN Prognose	Mutations-Anteil (%) REPLI-g®	Mutations-Anteil (%) gDNA	Mutations-Anteil (%) WS
34266380	SRSF2	c.284C>T	p.P95L	Somatische Mutation (COSM211506, COSM146288, COSM211029)	vielleicht schädlich	verträglich	51.26	51.71	8.87
	TET2	c.3058C>T	p.Q1020X	Somatische Mutation (COSM307363), SNP(rs375539032)			46.92	46.47	6.81
	TET2	c.5666C>A	p.P1889H	Ø	vermutlich schädlich	schädlich	39.00	47.28	6.16
34478735	SRSF2	c.284C>T	p.P95L	Somatische Mutation (COSM211506, COSM146288, COSM211029)	vielleicht schädlich	verträglich	51.95	59.46	8.87
	TET2	c.3058C>T	p.Q1020X	Somatische Mutation (COSM307363), SNP(rs375539032)			49.36	53.21	6.81
	TET2	c.5666C>A	p.P1889H	Ø	vermutlich schädlich	schädlich	51.99	47.02	6.16

REPLI-g®= REPLI-g® DNA *whole genome amplificated DNA*, **gDNA**=genomische DNA, **WS**= DNA isoliert aus der Wangenschleimhaut, **Ø**= nicht bezeichnet

4.2.1.3 Mutationskinetik unter Azacitidin-Therapie

Zur Untersuchung der Mutationskinetik im Verlauf wurden zu jedem Patienten die jeweils zusammengehörigen Probenpaare vom Zeitpunkt der Erstdiagnose und vom Zeitpunkt des besten Ansprechens unter der epigenetischen Therapie mit Azacitidin zugeordnet. Durch die Gegenüberstellung beider Proben war die Beurteilung der Mutationskinetik im Verlauf unter Azacitidin für jede detektierte somatische Genmutation möglich. Insgesamt konnten 27 Mutationsverläufe genauer betrachtet werden, 14 in der MDS- und 13 in der CMML-Kohorte. Es konnte gezeigt werden, dass die quantitative Mutationsrate im Verlauf unter Azacitidin im Vergleich zur Erstdiagnose in 19/27 Mutationsverläufen (70%) und 5 Patienten konstant geblieben ist, in 5/27 Mutationsverläufen (19%) und 5 Patienten abgenommen hat und in 3/27 Mutationsverläufen (11%) und 3 Patienten zugenommen hat. Um von einer Zu- oder Abnahme der Mutationsrate und somit Veränderung der Mutationskinetik zu sprechen, wurde ein cut-off von 25% festgelegt, was bedeutet, dass sich die Werte zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt der Verlaufsprobe um $\geq 25\%$ unterscheiden mussten. Eine Veränderung der Mutationskinetik um $< 25\%$ wurde als konstant definiert.

Zu den 19 Genen, die eine konstante Mutationskinetik im Verlauf unter Azacitidin aufwiesen, zählten *TET2* (n=5; 26%), *RUNX1* (n=4; 21%), *EZH2* (n=3; 16%), *SRSF2* (n=2; 11%), *DNMT3A* (n=2; 11%), *IDH2* (n=1; 5%), *ASXL1* (n=1; 5%) und *ZRSR2* (n=1; 5%) (**Abb. 13**).

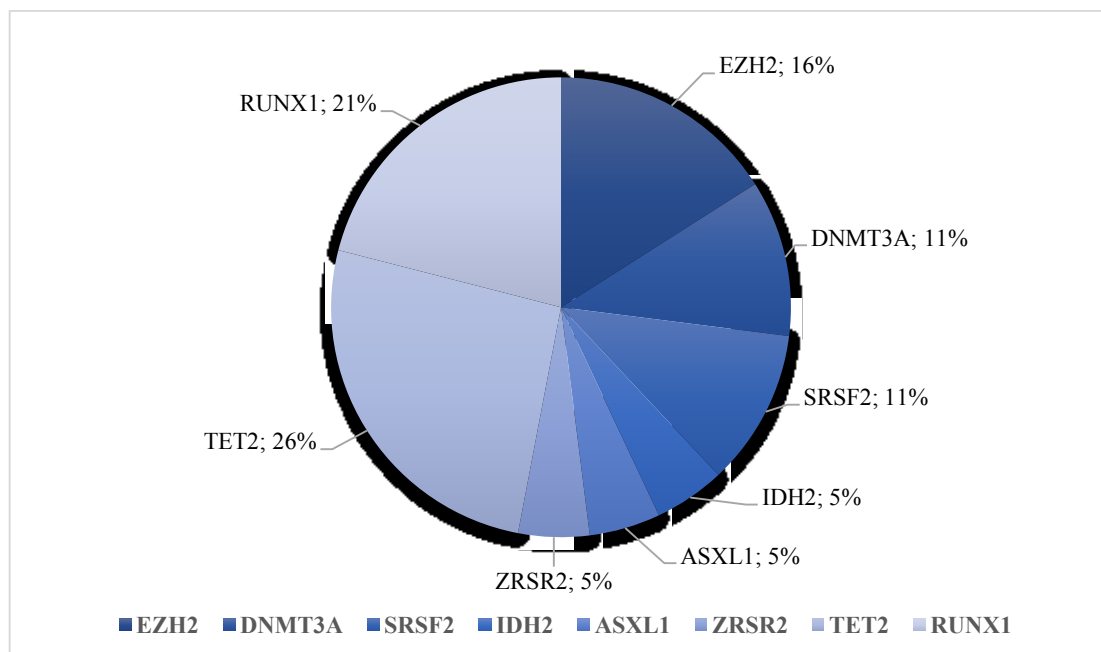


Abbildung 13: Grafische Darstellung der Gene mit einer konstanten Mutationskinetik unter Vidaza®-Therapie: *TET2* (n=5; 26%), *RUNX1* (n=4; 21%), *EZH2* (n=3; 16%), *SRSF2* (n=2; 11%), *DNMT3A* (n=2; 11%), *IDH2* (n=1; 5%), *ASXL1* (n=1; 5%) und *ZRSR2* (n=1; 5%)

Hierbei ist wiederum auffällig, dass vor allem Gene, die als epigenetische Regulatoren fungieren, betroffen waren. Fast alle Patienten mit mindestens einer *TET2*-Mutation erreichten die klonale Stabilisierung.

In fünf Mutationsverläufen wurde zum Zeitpunkt der Erstdiagnose in den Genen *TP53* (n=1), *ASXL1* (n=1), *SRSF2* (n=1) und *KRAS* (n=2) somatische Mutationen detektiert, die im Verlauf unter Therapie mit Vidaza® eine reduzierte Mutationsrate aufwiesen. Bei den Genen *TP53*, *ASXL1* und *KRAS* konnten die Mutationen in der Verlaufsprobe nicht mehr nachgewiesen werden. Eine Zunahme der Mutationslast wurde in drei Mutationsverläufen verzeichnet und in den Genen *KRAS* (n=2) und *ETV6* (n=1) detektiert.

Tabelle 21 und **22** fassen die wichtigsten Informationen aus **Tabelle 19** und **20** zusammen. Für jeden Patienten der MDS- sowie CMML-Kohorte werden die detektierten Genmutationen im Verlauf unter Therpieverlauf mit der hypomethylierenden Substanz verglichen. Somit ist auf einem Blick die Mutationslast des Klons zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und zum Zeitpunkt des besten therapeutischen Ansprechens dargestellt. Daraus ergibt sich dann die Mutationskinetik im Verlauf.

4.2.1.3.1 MDS-Kohorte

Tabelle 21: Vergleich der Genmutationslast zum Zeitpunkt der Erstdiagnose vs. Zeitpunkt des besten therapeutischen Ansprechens bei der MDS-Kohorte

Patient	Gen	Mutationen Erstdiagnose	Mutationen Verlaufsprobe	Veränderung in %
1	<i>TET2</i>	10-167	11-610	-3.6%
		36.4%	35.1%	
2	<i>TP53</i>	33026681	33433770	-100.0%
		41.8%	-	
3	<i>DNMT3A</i>	33433638	33596022	+3.2%
	<i>IDH2</i>	35.8%	37%	-12.6%
4	<i>ASXL1</i>	33697558	34153263	-100.0%
		39.1%	-	
5	<i>TET2</i>	33703452	34098283	-23.6%
	<i>ZRSR2</i>	85.3%	65.2%	-14.7%
6	<i>KRAS</i>	33917287	13075164	-100.0%
		15.4%	-	
7	<i>KRAS</i>	33379468	33880449	+100.0%
	<i>RUNX1</i>	-	13.4%	+22.3%
	<i>SRSF2</i>	37.9%	48.8%	-0.4%
8	<i>EZH2</i>	51.7%	51.5%	-3.1%
	<i>EZH2</i>	33239338	33403660	+2.4%
	<i>RUNX1</i>	44%	45.1%	+2.4%
	<i>EZH2</i>	44.1%	40.9%	
	<i>RUNX1</i>	39.9%		

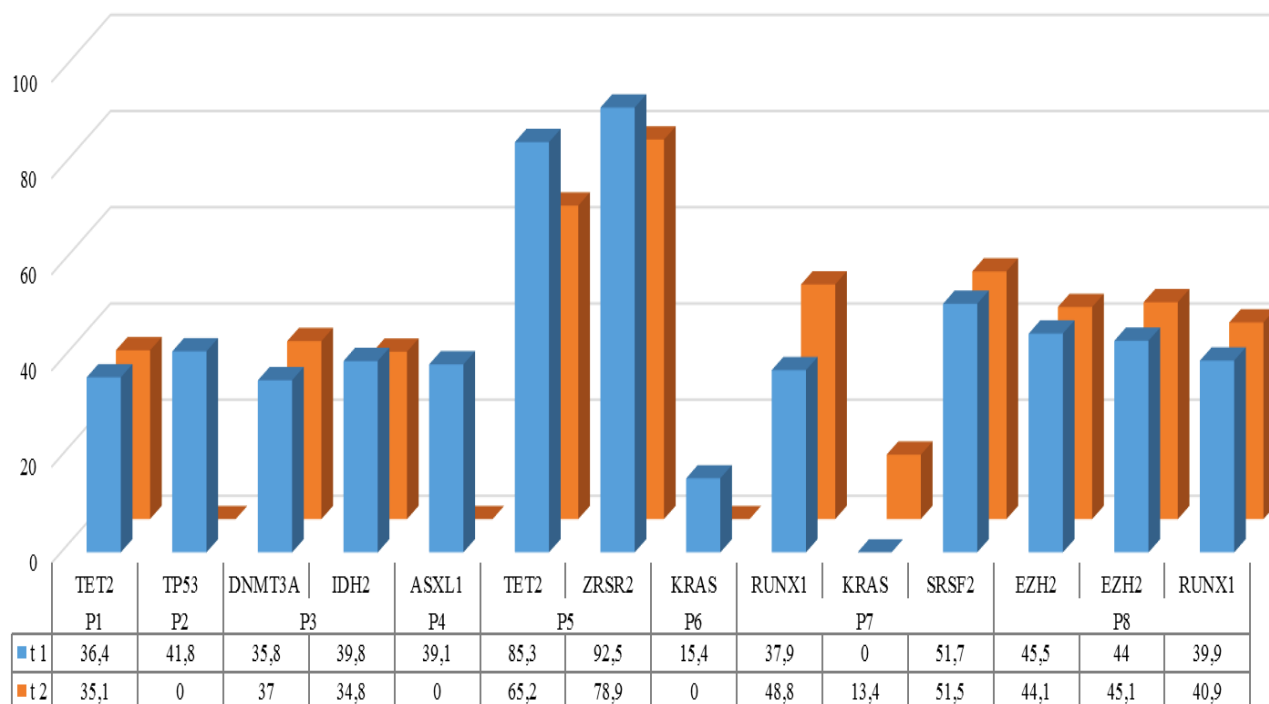
4.2.1.3.2 CMML-Kohorte

Tabelle 22: Vergleich der Genmutationslast zum Zeitpunkt der Erstdiagnose vs. Zeitpunkt des besten therapeutischen Ansprechens bei der CMML-Kohorte

Patient	Gen	Mutationen Erstdiagnose	Mutationen Verlaufsprobe	Veränderung in %
11	<i>KRAS</i>	13060670	34191665	+100.0%
		-	10.6%	
12	<i>KRAS</i>	13074281	34535644	-100.0%
		20.9%	-	
13	<i>ASXL1</i> <i>DNMT3A</i> <i>ETV6</i> <i>EZH2</i> <i>RUNX1</i> <i>RUNX1</i>	33935230	34374189	+2.0% -5.5% +100.0% 0% -1.2% +2.4%
		43.6%	44.5%	
		47.5%	44.9%	
		-	6.5%	
		100%	100%	
		40.5%	40%	
14	<i>SRSF2</i> <i>TET2</i>	34236542	34554713	-28.7% -16.1%
		49.4% 86.3%	35.2% 72.4%	
15	<i>SRSF2</i> <i>TET2</i> <i>TET2</i>	34266380	34478735	+13.1% +12.6% -0.6%
		51.7%	59.5%	
		46.5% 47.3%	53.2% 47.0%	

Mutationskinetik im Verlauf unter Vidaza®-Therapie

a MDS-Patientenkohorte (Patienten 1-8)



b CMML-Patientenkohorte (Patienten 11-15)

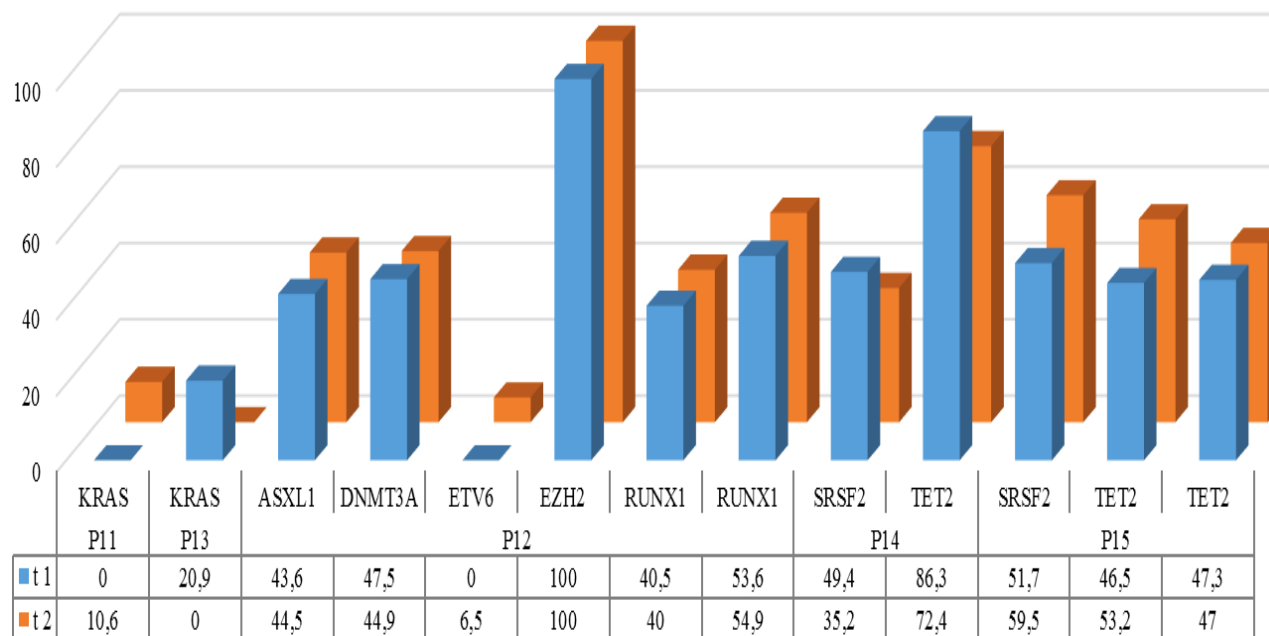


Abbildung 14 (a-b): Grafische Darstellung der Mutationsanteile (%) für jedes einzelne Gen (27) zu zwei verschiedenen Zeitpunkten für die MDS-Kohorte (a) und für die CMML-Kohorte (b). Auf dem ersten Blick bleibt in beiden Kohorten die Tendenz der Mutationskinetik im Therapieverlauf unter Azacitidin gleich. Konkret wurde eine konstante Mutationslast in 19/27 Mutationsverläufen (70%) verzeichnet, eine Abnahme bei 5/27 (19%) und eine Zunahme bei 3/27 (11%). t1= Mutation zum Zeitpunkt der Erstdiagnose; t2= Mutation zum Zeitpunkt des besten Ansprechens unter Azacitidin; P=Patient.

4.2.2 Einzelnukleotid-Polymorphismen mit möglicherweise pathogener Bedeutung

Dabei handelte es sich um Variationen, die sowohl in der REPLI-g®, genomischen und der Wangenschleimhaut DNA detektiert wurden. Diese Genveränderungen sind nicht nur auf die Zellen des hämatopoetischen Kompartiments beschränkt und können zudem an die nachfolgende Generation weitervererbt werden. Diese Polymorphismen, dargestellt in **Tabelle 23** wurden im Rahmen der Doktorarbeit von weiteren Analysen ausgeschlossen.

Tabelle 23: Keimbahn-Polymorphismen, detektiert in der MDS- und CMML-Patientenkohorte

Probe	Gen	DNA-Variation	Protein-Variation	Ensembl Browser	PolyPhen2 Prognose	PROVEAN Prognose	Mutationsanteil (%) REPLI-g®	Mutationsanteil (%) gDNA	Mutationsanteil (%) WS
11-795	RUNX1	c.86T>C	p.L29S	Somatische Mutation (COSM24756), SNP (rs111527738)	vielleicht schädlich	verträglich	44,31	48,25	49,68
12-325							44,21	48,76	49,68
13060670	ASXL1	c.2124delG	p.M708Ifs*12	∅			47,95	44,2	40,01
34191665							52,74	46,84	40,01
13060670	SETBP1	c.2608G>A	p.G870S	Somatische Mutation (COSM1234973), SNP (rs267607040)	schädlich	schädlich	45,09	46,83	37,1
34191665							42,51	41,89	37,1
13060670	SRSF2	c.284C>A	p.P95H	Somatische Mutation (COSM211505, COSM211504, COSM211028)	schädlich	schädlich	53,02	47,03	43,73
34191665							43,71	44	43,73
33880449	NRAS	c.35G>A	p.G12D	Somatische Mutation (COSM564), SNP (rs121913237)	vielleicht schädlich	schädlich	4,94	7,72	4,82

REPLI-g®= REPLI-g® DNA oder auch *whole genome amplified DNA*, gDNA=genomische DNA, WS= DNA isoliert aus der Wangenschleimhaut, ∅= nicht bezeichnet

4.2.3 Bekannte Einzelnukleotid-Polymorphismen ohne pathologische Bedeutung

Siehe Anhang **Tabelle 24**

4.3 Klinische Fälle

Die gewonnenen molekulargenetischen Daten wurden beispielhaft an drei ausgewählten Patienten in Zusammenschau mit klinischen Parametern und den jeweiligen zytomorphologischen Befunden korreliert und analysiert.

4.3.1 Klinischer Fall Nr. 1 (Patient #2)

Die Patientin erhielt zur Abklärung einer Bizytopenie und der Verdachtdiagnose MDS am 10.01.2013 eine Beckenkammpunktion (BKP). Zytogenetisch fand sich ein komplex aberranter Karyotyp mit u.a. Hyperdiploidie und Trisomie 11. Der Befund der BKP vom 10.01.2013 (**Abb. 15**) ergab zytologisch ein hypo-, z.T. auch normozelluläres Knochenmark. Es zeigten sich Dysplasiezeichen in allen drei Zellreihen. Der Blastenanteil, bezogen auf die kernhaltigen Zellen betrug knapp über 20%. Vereinbar war dieses Bild mit dem Übergang eines Myelodysplastischen Syndroms (MDS) vom Subtyp einer refraktären Anämie mit Blastenexzess (RAEB II nach WHO) zur sekundären akuten myeloischen Leukämie (sAML).

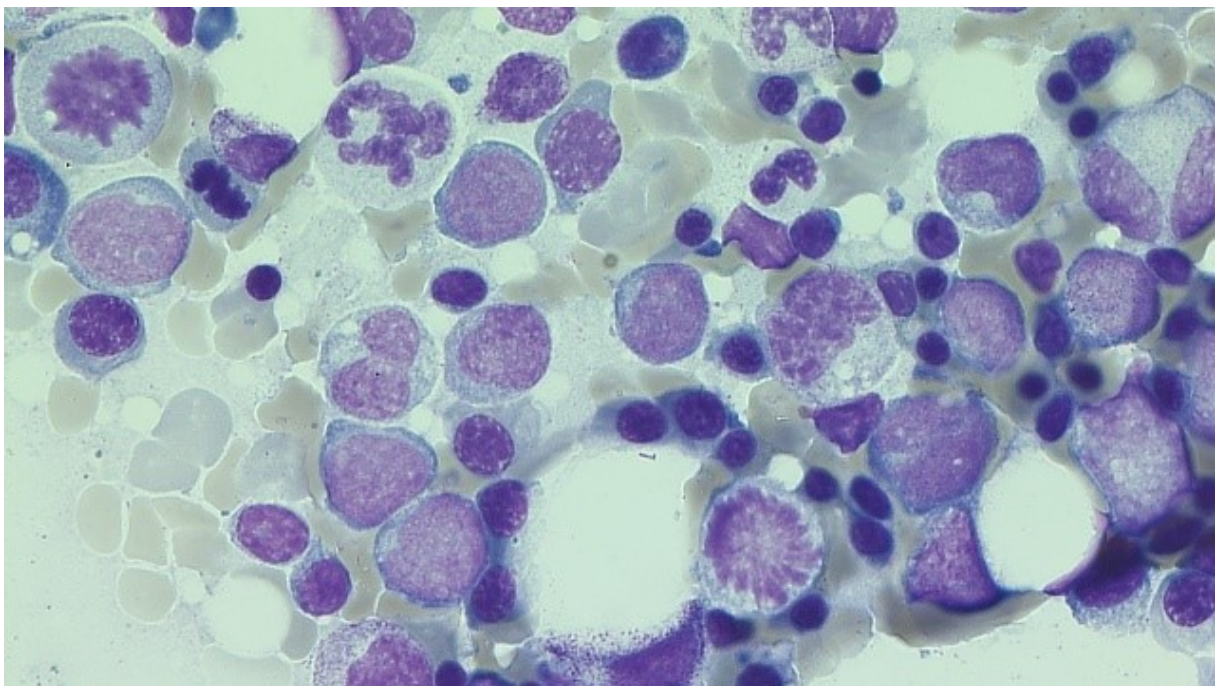


Abbildung 15: Knochenmarkzytologie vom 10.01.2013; Reg-Nr.:37/13; 630-fache Vergrößerung

Mittels IPSS-R-Score wurde ein Punktwert von 6,5 ermittelt. Dies führte dazu, dass die Patientin in die Hochrisikogruppe eingestuft wurde und unverzüglich die Einleitung einer epigenetischen Therapie mit Azacitidin im Standardschema 75 mg/m² an sieben

aufeinanderfolgenden Tagen im 28-Tage-Zyklus erfolgte. Nach sieben Therapiekursen wurde am 08.08.2013 eine weitere BKP (**Abb. 16**) zur Verlaufskontrolle durchgeführt. Zytologisch und histologisch zeigte sich eine deutliche Befundverbesserung mit Blastenreduktion. Der nicht-erythroide Blastenanteil hatte sich auf 2% reduziert.

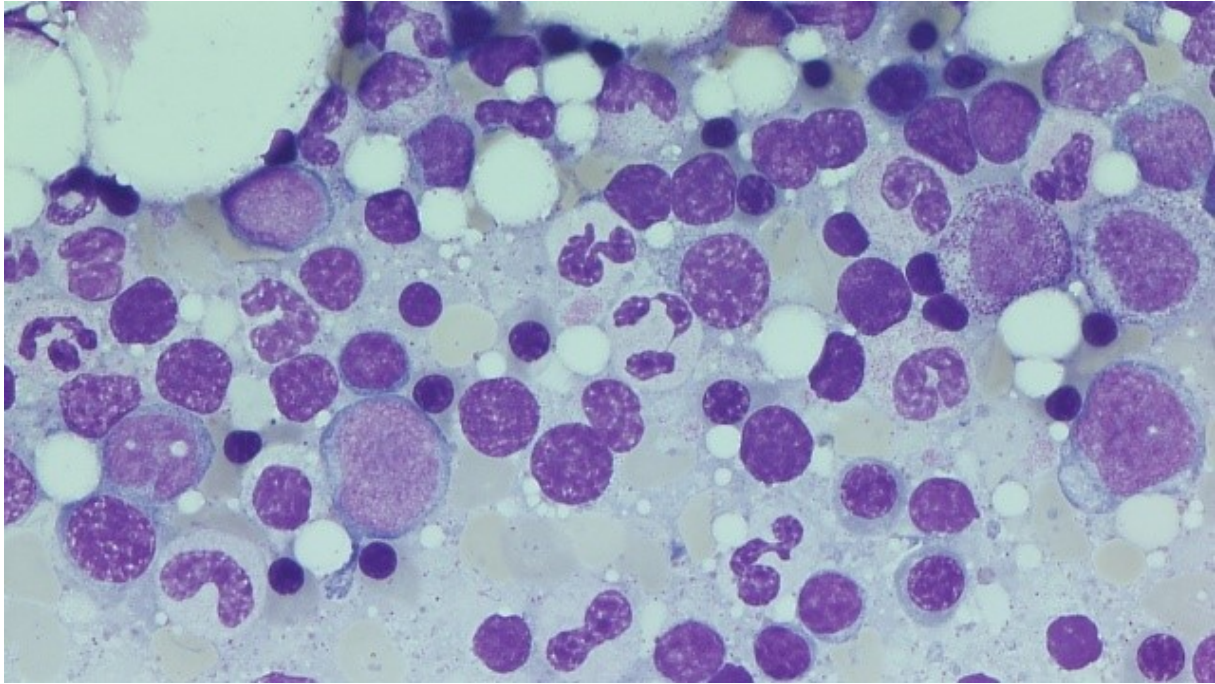


Abbildung 16: Knochenmarkzytologie vom 08.08.2013; Reg-Nr.:646/13; 630-fache Vergrößerung

Die molekulargenetische Untersuchung ergab zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (Probe 33056681 vom 10.01.2013) eine Mutation im *TP53*-Gen (c.818G>A, p.R273H) mit einer Mutationsrate (*variant allele fraction*) von 42%. Diese Mutation war im Verlauf unter Azacitidin-Therapie zum Zeitpunkt des besten Ansprechens (Probe 33433770 vom 08.08.2013) nicht mehr nachweisbar. Bei der Analyse von Wangenschleimhaut-DNA der Patientin konnte keine Mutation detektiert werden, sodass es sich demnach um eine somatische Mutation handelte. Zusammenfassend sprach die Patientin hämatologisch und klinisch auf die Therapie mit Azacitidin gut an, sodass ein Rückgang des aberranten Zellklons verzeichnet werden konnte und die Gabe von Vidaza[®] fortgesetzt wurde.

4.3.2 Klinischer Fall Nr. 2 (Patient #8)

Bei einem 64-jährigen Patienten wurde aufgrund einer zunehmenden Leukozytose und Thrombozytopenie bei Verdacht auf ein Myelodysplastisches Syndrom eine BKP veranlasst. Zytogenetisch zeigte sich ein unauffälliger Karyotyp (46, XY). In der BKP vom 22.04.2013 (**Abb. 17**) zeichnete sich insgesamt ein proliferatives und dysplastisches Gesamtbild ab. Konkret fanden sich ein hyperzelluläres Knochenmark, eine gestörte Reifung der Granulopoese, eine dysplastische Megakaryopoese (Mikrokaryozyten) sowie ein erhöhter nicht-erythroider Blastenanteil von 8%. Diese Befunde sprachen für ein MDS vom Typ einer RAEB I gemäß WHO.

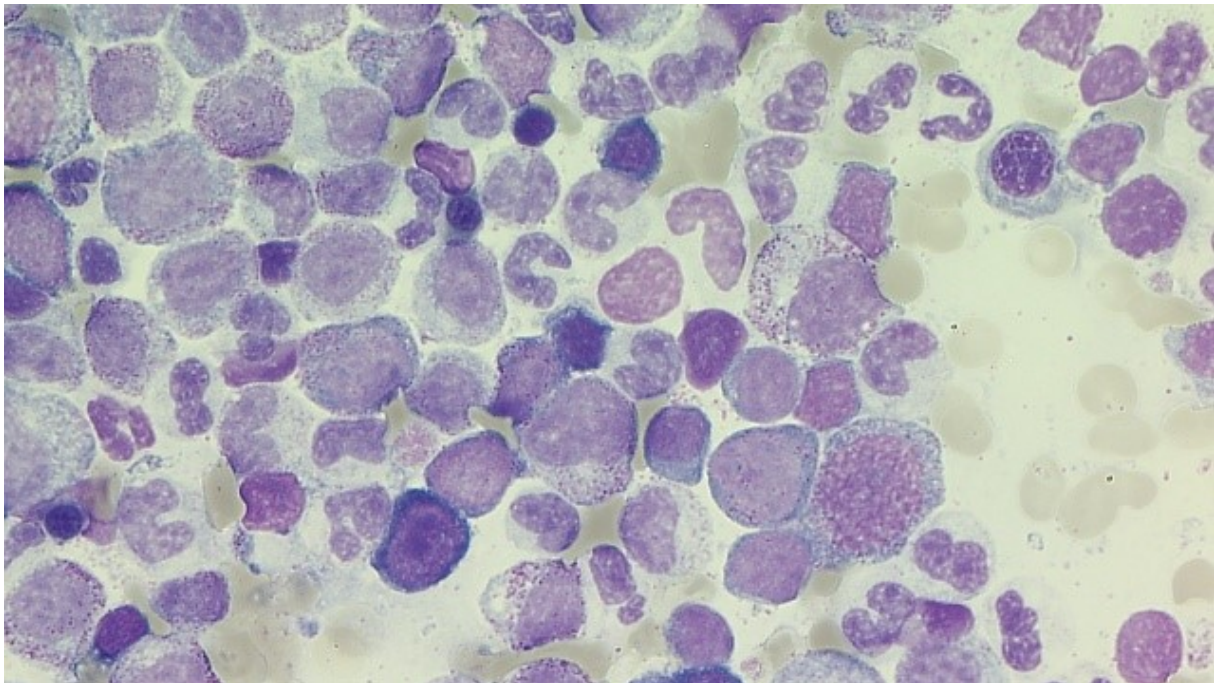


Abbildung 17: Knochenmarkzytologie mit Blasten und mittleren Reifungsstufen vom 22.04.2013; Reg-Nr.: 339/13; 630-fache Vergrößerung

Nach IPSS-R-Score war von einem MDS mit hohem Risiko auszugehen, sodass am 06.05.2013 eine systemische Therapie mit Azacitidin eingeleitet wurde. Nach drei Zyklen Vidaza erfolgte am 14.08.2013 eine Kontrolluntersuchung des Knochenmarks (**Abb. 18**). Diese zeigte ein überwiegend hyperzelluläres Knochenmark mit Dysplasiezeichen in allen drei Zellreihen. Der nicht-erythroide Blastenanteil betrug 1%. Zytomorphologisch wurde eine Blastenreduktion <5% unter Vidaza® Therapie erreicht bei MDS-RAEB-I zum Zeitpunkt der Diagnose.

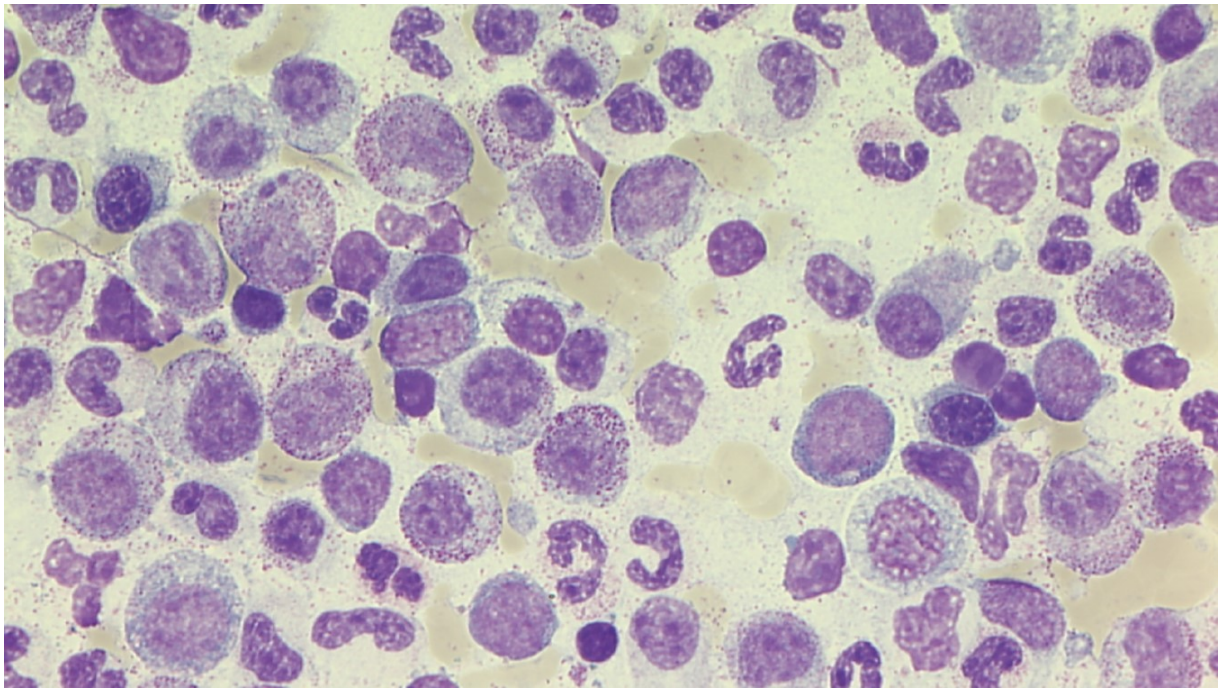


Abbildung 18: Knochenmarkzytologie vom 14.08.2013; Reg.Nr. 666/13; 630-fache Vergrößerung

Die molekulargenetische Analyse zum Zeitpunkt der Erstdiagnose (Probe 33239338 vom 22.04.2013) erbrachte den Nachweis von drei Mutationen in zwei unterschiedlichen Genen. Dabei handelte es sich um zwei Mutationen im *EZH2*-Gen (c.73C>T, p.R25X und c.1976G>C, p.R659T) sowie eine Mutation im *RUNX1*-Gen (c.959_960insAAGGTAC, p.M320Ifs*255). Diese Mutationen konnten alle im Verlauf unter Azacitidin-Therapie zum Zeitpunkt des besten Ansprechens (Probe 33403660 vom 14.08.2013) weiter nachgewiesen werden. Die Mutationskinetik war bei diesem Patienten nahezu konstant geblieben. Bei der Analyse von Wangenschleimhaut-DNA des Patienten zeigten sich keine Mutationen, sodass es sich bei allen drei Mutationen um somatische handelte.

4.3.3 Klinischer Fall Nr. 3 (Patient #11)

Eine 54-jährige Patientin stellte sich aufgrund von unklaren Blutbildveränderungen, diagnostiziert bei einer Routine-Untersuchung durch den Hausarzt, im Februar 2014 erstmals in der Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie im Universitätsklinikum Jena vor. Unter dem Verdacht einer hämatologischen Systemerkrankung wurde zur weiterführenden Diagnostik am 19.02.2014 eine BKP durchgeführt (**Abb. 19**). Die zytogenetische Analyse ergab den Nachweis einer 7q31- Deletion bzw. einer Monosomie 7. Zytologisch dominierte ein stark hyperzelluläres Knochenmark mit wenig ausreifender, deutlich gesteigerter dysplastischer Granulopoese. Es bestand eine fokale Eosinophilie. Des Weiteren waren alle anderen Zellreihen ebenfalls pathologisch verändert (trilineäre Dysplasie). Der Blastengehalt wurde histologisch mit 17% (Spannbreite 7-19%) angegeben. In Korrelation mit der Monozytose des peripheren Blutes sowie dem Blastenanteil im Knochenmark konnte die Diagnose einer chronischen myelomonozytäre Leukämie (CMML-2 nach WHO Klassifikation 2008, proliferativer Typ) gestellt werden.

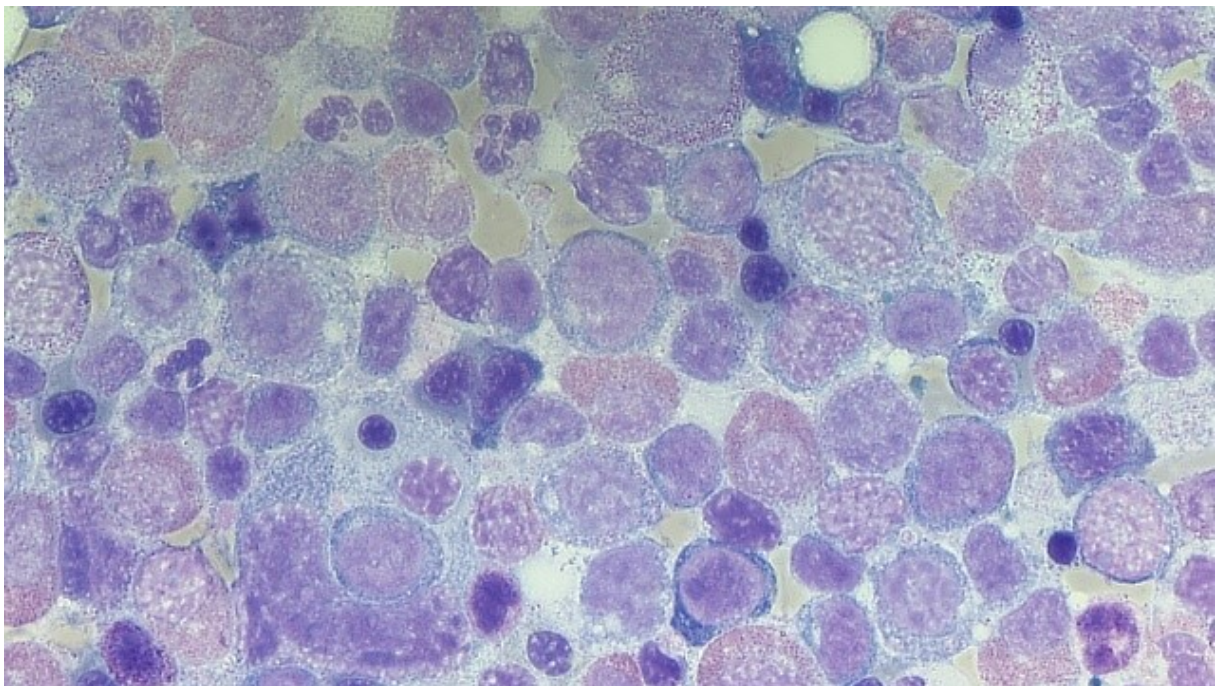


Abbildung 19: Knochenmarkzytologie (mit Eosinophilie) vom 19.02.2014; Reg.Nr. 136/14; 630-fache Vergrößerung

Die Risikoabschätzung nach dem IPSS-R Score lag bei 6 und ergab damit die Zuordnung zur Hochrisikogruppe, sodass gemäß der bestehenden Indikation eine Differenzierungstherapie mit 5-Azacitidin empfohlen wurde. Nach sieben Therapiezyklen unter Vidaza[®] erfolgte zur

Überprüfung des Therapieerfolges eine weitere BKP am 30.09.2014. In der Knochenmarksdiagnostik (**Abb. 20**) zeigte sich ein hyperzelluläres Knochenmark mit hochgradigen dysplastischen Ausreifungsstörungen in allen drei Zellbildungsreihen. Der Blastenanteil lag bei 12%. (Spannbreite 9-15%). Neben den weiterhin bestehenden proliferativen und dysplastischen Komponenten veränderte sich die Blastenzahl im Vergleich zu Therapiebeginn nur geringfügig.

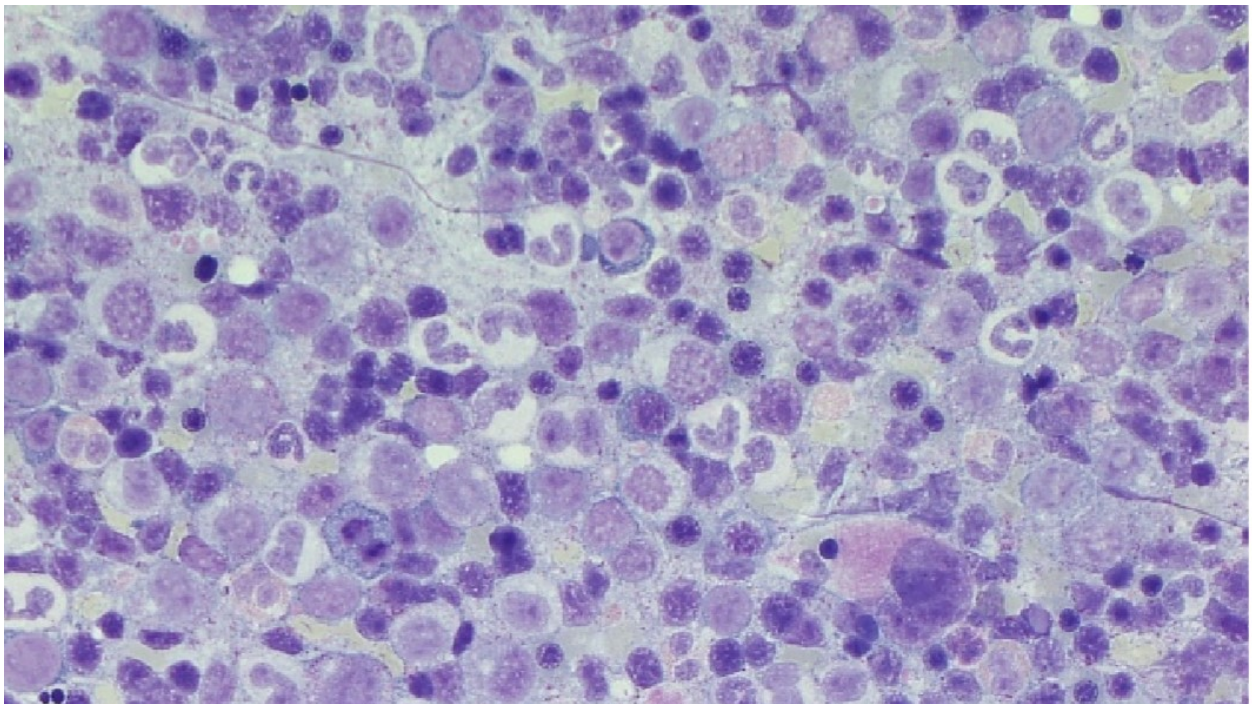


Abbildung 20: Knochenmarkzytologie vom 30.09.2014; Reg.Nr. 801/14; 400-fache Vergrößerung

Mithilfe der molekulargenetischen Untersuchung konnten in beiden Proben (Probe 13060670 vom 19.02.2014 und Probe 34191665 vom 30.09.2014) drei bereits bekannte Keimbahn-Variationen im *ASXL1*-Gen (c.2124delG, p.M708Ifs*12), *SETBP1*-Gen (c.2608G>A, p.G870S) und *SRSF2*-Gen (c.284C>A, p.P95H) sowohl in der genomischen also auch in der Wangenschleimhaut-DNA bestätigt werden. Zum Zeitpunkt der Verlaufssprobe 34191665 wurde eine Veränderung im *KRAS*- Gen (c.173C>T, p.T58I) mit einer Mutationsrate von 11% beschrieben. Diese Mutation hat sich erst im Verlauf der Therapie entwickelt und war zum Zeitpunkt der Erstdiagnose noch nicht nachweisbar. Bei der Analyse von Wangenschleimhaut-DNA der Patientin zeigte sich keine Veränderung, sodass es sich bei der *KRAS*-Mutation um eine somatische Mutation handelte.

5 Diskussion

Die Methode des NGS gilt als Meilenstein zur Verbesserung der genetischen Charakterisierung hämatologischer Neoplasien und ermöglicht einen detaillierten Einblick in die Heterogenität der Erkrankungen. Durch zahlreiche Studien hat sich das Spektrum bekannter Mutationen in den letzten Jahren beträchtlich erweitert. Allerdings werden keine Aberrationen als MDS, MPN, MDS/MPN oder AML spezifisch beschrieben (Cazzola *et al.* 2013), sondern es besteht eine große Anzahl an Überschneidungen in diesem Erkrankungsspektrum. Bei dem heutigen Stand der Technik ist der Gebrauch von sogenannten Gen-Panels zur Sequenzierung z.B. bestehend aus 20-40 Zielgenen für den Anwender eine ausgezeichnete Analysemethode. Daher wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit ein Gen-Panel bestehend aus den 30 häufigsten Leukämie-assoziierten Genen verwendet. Diese 30 Gene wurden nach sorgfältiger Literaturrecherche aufgrund ihrer Häufigkeit für Mutationen in myeloischen Neoplasien ausgewählt (Rinke *et al.* 2013). Die Methode erlaubt es, den Gen-Assay beliebig zu erweitern um andere, z.B. in der Literatur neu beschriebene MDS/CMML assoziierte Gene. Alternativ setzt sich das Verfahren der Exomsequenzierung (Whole Exome Sequencing) und Genomsequenzierung (*Whole Genome Sequencing*) mehr und mehr durch.

Es ist zu beachten, dass das Probenmaterial der Patienten immer limitiert ist, sodass es in dieser Arbeit nicht primär um die Neudetektion von Genmutationen ging, sondern darum, die gefundenen Mutationen zum Zeitpunkt der Erstdiagnose unter Therapie mit Azacitidin weiter zu verfolgen, um anschließend eine Aussage zur Mutationskinetik zu erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher der Fokus auf die am häufigsten beschriebenen Gene gelegt.

Spezifische Variationen des hämatopoetischen Systems sollten nur in der gDNA präsent sein. Zum Teil allerdings bestand eine Diskrepanz zwischen Mutationsfrequenz der Leukozyten- und Wangenschleimhaut-DNA. Ursächlich für den Nachweis einer minimalen Mutationsrate/Kontamination in der Wangenschleimhaut-Probe könnte eine kleine Verletzung, ausgelöst durch den Tupfer in der Mundhöhle sein. Auch Speichelanteile, die Leukozyten enthalten, können das Ergebnis der Probe verfälschen. Quelle der DNA können alle kernhaltige Zellen sein, sodass unterschiedliche Faktoren zu einer Kontamination der isolierten Probe führen können. Manche Forscher kritisieren daher die Verwendung von Wangenschleimhaut DNA zur Validierung von somatischen Mutationen. Für unsere Fragestellung war die

Untersuchung von Wangenschleimhaut DNA allerdings ausreichend, da durch die quantitative NGS-Analyse eine klare Aussage möglich war.

Das Screening der häufigsten leukämie-assoziierten Gene identifizierte multiple somatische Mutationen v.a. in *TET2*-, *EZH2*-, *DNMT3A*-, *ASXL1*- und *IDH2*-Genen, die zur Heterogenität des Krankheitsphänotyps beitragen. Die Ergebnisse zur Prävalenz von Genmutationen bei der jeweiligen Erkrankung MDS bzw. CMML deckten sich mit den Literaturangaben (Mason *et al.* 2015, Kulasekararaj *et al.* 2013). Einige der detektierten Gene wurden bereits weiterführend untersucht, um genauere prognostische Einstufungen vornehmen zu können (Bejar *et al.* 2011). Eine ungünstige Prognose konnte bei Mutationen im *ASXL1*-Gen aufgrund einer Blastenvermehrung, einem hohen AML-Risiko und einem kurzen Gesamtüberleben nachgewiesen werden (Thol *et al.* 2011). Ebenfalls als prognostisch ungünstig wurden Mutationen im *RUNX1*- und *EZH2*-Gen beschrieben (Ernst *et al.* 2010) sowie im Tumorsuppressorgen *TP53*. Jenes ist häufig bei Patienten mit komplexem Karyotyp oder isolierter 5q-Deletion vorzufinden (Jadersten *et al.* 2011). Auch die Patientin #2 aus der MDS-Kohorte, bei der eine somatische Mutation im *TP53* Gen (c.818G>A; p.R273H) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose detektiert wurde, besaß einen komplex-aberranten Karyotyp. Der Nachweis von Mutationen im *DNMT3A*-Gen ist mit einer raschen Progression von einem MDS in eine sAML assoziiert (Walter *et al.* 2011). Bei *TET2* Mutationen ist bisher kein klarer prognostischer Einfluss beschrieben (Smith *et al.* 2010).

Die Durchführung eines molekularen Screening unter Einbezug von unterschiedlichen Mutationen könnte künftig eine große Rolle bei diagnostischer Unklarheit und Verdacht auf eine hämatologische Erkrankung spielen. Zur molekularen Diagnostik wurde in der Literatur für MDS-Patienten beispielsweise das diagnostische und prognostisch relevante Genpanel von Bejar *et al* beschrieben. Dieses besteht aus insgesamt fünf Genen (*ASXL1*, *EZH2*, *ETV6*, *RUNX1*, *TP53*). Für CMML-Patienten wurde ein Genpanel aus vier Genen (*ASXL1*, *SRSF2*, *CBL*, *IDH2*) beschrieben (Itzykson *et al.* 2013b).

Durch die nachfolgende Betrachtung der Mutationskinetik konnte gezeigt werden, dass ein klinisch gutes Ansprechen auf die epigenetische Therapie mit Azacitidin bei Patienten mit MDS und CMML in der Mehrzahl mit einer klonalen Stabilisierung assoziiert war. Ein klinisch gutes Ansprechen auf hypomethylierende Medikamente ist mit einer Re-expression von krankheitsbedingt abgeschalteten Genen assoziiert (Merlevede *et al.* 2016). Diese Beobachtung

zeigt, dass hypomethylierende Medikamente epigenetische Veränderungen, welche zum Krankheitsphänotyp beitragen, unterdrücken können (Aucagne *et al.* 2011) und darüber hinaus die Konkurrenzfähigkeit, der am meisten mutierten Zellen im Progenitor- und Stammzellkompartiment verringern können (Itzykson *et al.* 2013b, Itzykson und Solary 2013), allerdings keine Reduktion der mutierten Allel-Belastung bewirken können.

Bei den drei somatischen Mutationen in den Genen *TP53* (*c.818G>A, p.R273H*), *ASXL1* (*c.2449_2450insA, p.T817Nfs*11*), *KRAS* (*c.35G>T, p.G12V*) und *KRAS* (*c.38G>A, p.G13D*), bei denen eine komplette Abnahme der Mutationskinetik im Therapieverlauf aufgezeichnet werden konnte, ist es gelungen den Klon mit Wachstumsvorteil zu eliminieren und die Hämatopoese zu normalisieren.

Warum bei drei Klonen eine Zunahme der Mutationskinetik unter der Therapie registriert wurde, könnte mit einer Zellselektion unter Azacitidin-Therapie zusammenhängen. Das bedeutet, dass sich die Klone mit Mutation vermutlich unter der Therapie weiter vermehren und dadurch der Mutationsanteil weiter zunimmt. Ein oder mehrere Klone überleben die initiale Therapie mit Azacitidin und akkumulieren weitere Mutationen. Es selektieren sich Subklone mit Überlebensvorteil, proliferieren und können sogar potentiell einen Rückfall und somit eine Transformation zur AML auslösen (Merlevede *et al.* 2016). Auch kann der Klon unter Therapie neue Mutationen erwerben und sich zum verursachenden Klon entwickeln (Ding *et al.* 2012).

Eine aktuelle Studie, fokussiert auf CMML Patienten, publizierte im Februar 2016 ähnliche Beobachtungen, die wiederum die Ergebnisse dieser Promotionsarbeit validieren. Bei Patienten, die klinisch gut auf die epigenetische Therapie mit Azacitidin ansprechen, konnte eine balancierte Hämatopoese wiederhergestellt werden, ohne dass die Anzahl an mutierten Klonen sank. Die Mutationslast blieb unter der Therapie mit der hypomethylierenden Substanz somit konstant. Das Auftreten neuer genetischer Ereignisse, die zur Evolution des leukämischen Klons und somit zur Transformation führten, kann nicht verhindert werden (Merlevede *et al.* 2016). Darüber hinaus konnte in der Studie von Merlevede *et al.* gezeigt werden, dass eine verlängerte Verabreichung von hypomethylierenden Medikamenten keinen Nutzen für CMML-Patienten hat, wenn eine hämatologische Verbesserung nicht nach einigen Therapiezyklen beobachtet wurde. Dies hängt laut der Studie mit spezifischen Mustern epigenetischer Veränderungen zusammen, die die Aktivität hypomethylierender Medikamente verhindert u.a.

durch die Suppression von Nukleosid-Transportern und metabolischer Enzyme (Navada *et al.* 2014, Treppendahl *et al.* 2014).

Seit einigen Jahren werden neue Stufenmodelle der Krebspathogenese diskutiert. Forscher gehen davon aus, dass multiple dynamische Prozesse, viele Jahre vor klinischer Manifestation einer hämatologischen Erkrankung ablaufen und eine Assoziation zwischen rekurrenten somatischen Genmutationen und der Krebsinzidenz bestehen. Der mehrstufige Mutationsprozess führt durch eine sogenannte *early initiation mutation* zur klonalen Expansion der hämatologischen Stammzelle. Wenn im Laufe der Jahre eine zusätzliche *cooperating mutation* im selben Klon auftritt, kann es am Ende zur malignen Transformation dieser Zellen kommen (Xie *et al.* 2014). Drei große Studien haben die DNA von tausenden gesunden älteren Probanden ohne Hinweise auf Vorliegen einer hämatologischen oder onkologischen Erkrankung mittels *Whole-exome-sequencing* analysiert (Genovese *et al.* 2014, Jaiswal *et al.* 2014, Xie *et al.* 2014). Genovese *et al.* zeigten, dass in 10% aller Personen älter als 65 Jahren klonale Hämatopoese mit somatischen Mutationen, aber nur in 1% bei jungen Personen unter 50 Jahren nachgewiesen werden konnte. Bei den drei am häufigsten betroffenen Genen handelt es sich um *DNMT3A*, *ASXL1* und *TET2*. Diese wurden jeweils mit einer niedrigen Mutationslast <50% nachgewiesen. Von den untersuchten Patienten entwickelten 42% eine hämatologische Krebserkrankung. Bei all diesen Patienten wurde eine klonale Evolution zum Zeitpunkt der Probenentnahme im Gesunden, 6 Monate vor Eintritt der Erkrankung nachgewiesen (Genovese *et al.* 2014).

Somit stellte sich auch für diese Arbeit die Frage, ob es sich bei den gefundenen somatischen Mutationen in der MDS- und CMML-Kohorte zum Zeitpunkt der Erstdiagnose nicht auch um altersassoziierte molekulare Aberrationen handeln könnte, die bereits vor Eintritt der Erkrankung vorhanden waren? Um diesbezüglich eine Antwort zu erhalten, müssten molekulargenetische Analysen von Genmaterial vor der Erstdiagnose erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde lediglich der Zeitrahmen zwischen Diagnose und Zeitpunkt des besten Ansprechens unter Vidaza-Therapie beleuchtet. Ein sehr interessanter Aspekt, der gegen das Bestehen der Mutationen vor Erstdiagnose spricht, ist, dass in gesunden älteren Personen häufig nur eine Mutation gefunden wurde (Jaiswal *et al.* 2014). Bei der analysierten MDS- und CMML-Kohorte sowie in anderen Sequenzierstudien wurden Mutationen in zwei oder mehr Treibergenen (*driver genes*) gefunden, die essentiell für die maligne Transformation sind. Daraus resultiert wiederum, dass bei gesunden Personen nur ein Klon durch eine frühe Mutation

(*initiating/early mutation*) betroffen ist, der somit nicht direkt zum Ausbruch einer Erkrankung führt. Menschen mit einer klonalen Hämatopoese können viele Jahre ohne Ausbruch einer hämatologischen Erkrankung leben. Wahrscheinlich haben gesunde ältere Personen mit Mutationen verglichen mit gesunden Probanden ohne Mutation ein erhöhtes Transformationsrisiko. Durch die Überwachung von Mutationsverläufen ist das Ansprechen auf eine spezifische Therapie evaluierbar. Die Identifikation von initiierenden Mutationen könnte die Möglichkeiten der personalisierten Therapien revolutionieren und die hämatologischen Erkrankungen an ihrem Ursprung bekämpfen.

6 Schlussfolgerung und Ausblick

Noch vor wenigen Jahren waren die Therapiemöglichkeiten der MDS und CMML aufgrund der mangelnden Studienlage in diesem Bereich stark begrenzt. Hauptsächlich verursacht wurde das Schattendasein dieser Erkrankungen durch ihr heterogenes klinisches Erscheinungsbild, der zytogenetischen Heterogenität und der komplexen Pathophysiologie. Aktuell sind beide hämatologischen Erkrankungen Bestandteil intensiver Forschungsbemühungen.

Im Rahmen der Zulassung von Azacitidin im Jahre 2009 wurden zahlreiche Behandlungserfolge publiziert, sodass Azacitidin als Therapiestandard zur Behandlung von Hochrisikopatienten etabliert wurde, die sich nicht für das Verfahren einer allogenen Stammzelltransplantation qualifizieren. In dieser Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass ein gutes Ansprechen auf die epigenetische Therapie mit Azacitidin bei Patienten mit myelodysplastischem Syndrom und chronischer myelomonozytärer Leukämie mit einer klonalen Stabilisierung assoziiert ist.

Das Verständnis, wie sich die detektierten Mutationen als prognostische und prädiktive Faktoren nutzen lassen, wie genetische und epigenetische Veränderungen zusammenpassen, die differente Kinetik einzelner und zusammenwirkender Mutationen und wie diese Veränderungen letztendlich effektiv durch zielgerichtete Therapien angegangen werden können, könnten in Zukunft die Behandlung von MDS- und CMML-Patienten maßgeblich verbessern. Zudem erlangen Patienten, die von diesen Erkrankungen betroffen sind, neue Hoffnung auf Besserung und Zugewinn an Lebensqualität sowie Überlebenszeit. Weiterführend wäre eine Vergrößerung der Patientenkohorte im Hinblick auf die Mutationskinetik anzustreben, um einen verstärkten Einblick in die molekulare Wirkungsweise von Azacitidin zu erhalten. Des Weiteren könnte die Untersuchung des Methylierungsstatus von Genen mögliche epigenetische Fehlregulationen aufdecken. Ob die epigenetischen Veränderungen durch Störungen im Mikromilieu des Knochenmarks hervorgerufen werden oder ob ein intrinsisches Charakteristikum des pathologischen Klons die Ursache darstellt, ist noch weitestgehend ungeklärt. Für die zweite Variante spricht allerdings, dass die erworbenen Mutationen, die bei MDS- und CMML-Patienten gefunden wurden, häufig epigenetische Regulatorgene betreffen.

7 Literaturverzeichnis

- Ades L, Sekeres MA, Wolffromm A, Teichman ML, Tiu RV, Itzykson R, Maciejewski JP, Dreyfus F, List AF, Fenaux P, Komrokji RS. 2013. Predictive factors of response and survival among chronic myelomonocytic leukemia patients treated with azacitidine. *Leuk Res*, 37 (6):609-613.
- Almeida A. 2013. Modifying disease in CMML: who responds to Azacitidine? *Leuk Res*, 37 (6):603-604.
- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127 (20):2391-2405.
- Aucagne R, Droin N, Paggetti J, Lagrange B, Largeot A, Hammann A, Bataille A, Martin L, Yan KP, Fenaux P, Losson R, Solary E, Bastie JN, Delva L. 2011. Transcription intermediary factor 1gamma is a tumor suppressor in mouse and human chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Invest*, 121 (6):2361-2370.
- Bejar R, Stevenson K, Abdel-Wahab O, Galili N, Nilsson B, Garcia-Manero G, Kantarjian H, Raza A, Levine RL, Neuberg D, Ebert BL. 2011. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*, 364 (26):2496-2506.
- Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick H, Sultan C, Cox C. 1994. The chronic myeloid leukaemias: guidelines for distinguishing chronic granulocytic, atypical chronic myeloid, and chronic myelomonocytic leukaemia. Proposals by the French-American-British Cooperative Leukaemia Group. *Br J Haematol*, 87 (4):746-754.
- Bernal T, Martinez-Camblor P, Sanchez-Garcia J, de Paz R, Luno E, Nomdedeu B, Ardanaz MT, Pedro C, Amigo ML, Xicoy B, Del Canizo C, Tormo M, Bargay J, Valcarcel D, Brunet S, Benlloch L, Sanz G. 2015. Effectiveness of azacitidine in unselected high-risk myelodysplastic syndromes: results from the Spanish registry. *Leukemia*.
- Cazzola M, Della Porta MG, Malcovati L. 2013. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. *Blood*, 122 (25):4021-4034.
- Celgene. 2009. Single Technology Appraisal (STA) of Vidaza (azacitidine); For the treatment of myelodysplastic syndrome. chronic myelomonocytic leukaemia and acute myeloid leukaemia. *Onkologie Journal*.
- Damm F, Thol F, Kosmider O, Kade S, Löffeld P, Dreyfus F, Stamatoullas-Bastard A, Tanguy-Schmidt A, Beyne-Rauzy O, de Botton S, Guerci-Bresler A, Gohring G, Schlegelberger B, Ganser A, Bernard OA, Fontenay M, Heuser M. 2012. SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes: clinical associations and prognostic implications. *Leukemia*, 26 (5):1137-1140.

- Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, Ritchey JK, Young MA, Lamprecht T, McLellan MD, McMichael JF, Wallis JW, Lu C, Shen D, Harris CC, Dooling DJ, Fulton RS, Fulton LL, Chen K, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, Magrini VJ, Cook L, McGrath SD, Vickery TL, Wendl MC, Heath S, Watson MA, Link DC, Tomasson MH, Shannon WD, Payton JE, Kulkarni S, Westervelt P, Walter MJ, Graubert TA, Mardis ER, Wilson RK, DiPersio JF. 2012. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 481 (7382):506-510.
- Dombret H, Seymour JF, Butrym A, Wierzbowska A, Selleslag D, Jang JH, Kumar R, Cavenagh J, Schuh AC, Candoni A, Recher C, Sandhu I, Bernal del Castillo T, Al-Ali HK, Martinelli G, Falantes J, Noppeney R, Stone RM, Minden MD, McIntyre H, Songer S, Lucy LM, Beach CL, Dohner H. 2015. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. *Blood*, 126 (3):291-299.
- Ernst T, Chase A, Zoi K, Waghorn K, Hidalgo-Curtis C, Score J, Jones A, Grand F, Reiter A, Hochhaus A, Cross NC. 2010. Transcription factor mutations in myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Haematologica*, 95 (9):1473-1480.
- Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore SD, Seymour JF, Bennett JM, Byrd J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach C, Silverman LR, International Vidaza High-Risk MDSSSG. 2009. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*, 10 (3):223-232.
- Gangat N, Patnaik MM, Tefferi A. 2016. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. *Am J Hematol*, 91 (1):76-89.
- Genovese G, Kahler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, Chambert K, Mick E, Neale BM, Fromer M, Purcell SM, Svantesson O, Landen M, Hoglund M, Lehmann S, Gabriel SB, Moran JL, Lander ES, Sullivan PF, Sklar P, Gronberg H, Hultman CM, McCarroll SA. 2014. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*, 371 (26):2477-2487.
- Germing U, Neukirchen J. 2013. How to treat patients with CMML? *Leuk Res*, 37 (6):605-606.
- Germing U, Kobbe G, Haas R, Gattermann N. 2013. Myelodysplastic syndromes: diagnosis, prognosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int*, 110 (46):783-790.
- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Sole F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F, Kantarjian H, Kuendgen A, Levis A, Malcovati L, Cazzola M, Cermak J, Fonatsch C, Le Beau MM, Slovak ML, Krieger O, Luebbert M, Maciejewski J, Magalhaes SM, Miyazaki Y, Pfeilstocker M, Sekeres M, Sperr WR, Stauder R, Tauro S, Valent P, Vallespi T, van de Loosdrecht AA, Germing U, Haase D. 2012. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 120 (12):2454-2465.
- Hofmann. Hrsg. 2013. Myelodysplastische Syndrome (MDS). DGHO-Onkopedia-Leitlinie.

- Itzykson R, Solary E. 2013. An evolutionary perspective on chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia*, 27 (7):1441-1450.
- Itzykson R, Fenaux P, Solary E. 2013a. Chronic myelomonocytic leukemia: myelodysplastic or myeloproliferative? *Best Pract Res Clin Haematol*, 26 (4):387-400.
- Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Morabito M, Preudhomme C, Berthon C, Ades L, Fenaux P, Platzbecker U, Gagey O, Rameau P, Meurice G, Orear C, Delhommeau F, Bernard OA, Fontenay M, Vainchenker W, Droin N, Solary E. 2013b. Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. *Blood*, 121 (12):2186-2198.
- Itzykson R, Kosmider O, Renneville A, Gelsi-Boyer V, Meggendorfer M, Morabito M, Berthon C, Ades L, Fenaux P, Beyne-Rauzy O, Vey N, Braun T, Haferlach T, Dreyfus F, Cross NC, Preudhomme C, Bernard OA, Fontenay M, Vainchenker W, Schnittger S, Birnbaum D, Droin N, Solary E. 2013c. Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia. *J Clin Oncol*, 31 (19):2428-2436.
- Jadersten M, Saft L, Smith A, Kulasekararaj A, Pomplun S, Gohring G, Hedlund A, Hast R, Schlegelberger B, Porwit A, Hellstrom-Lindberg E, Mufti GJ. 2011. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. *J Clin Oncol*, 29 (15):1971-1979.
- Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ, Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF, Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, Wilson JG, Neuberg D, Altshuler D, Ebert BL. 2014. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*, 371 (26):2488-2498.
- Kohlmann A, Grossmann V, Klein HU, Schindela S, Weiss T, Kazak B, Dicker F, Schnittger S, Dugas M, Kern W, Haferlach C, Haferlach T. 2010. Next-generation sequencing technology reveals a characteristic pattern of molecular mutations in 72.8% of chronic myelomonocytic leukemia by detecting frequent alterations in TET2, CBL, RAS, and RUNX1. *J Clin Oncol*, 28 (24):3858-3865.
- Kulasekararaj AG, Mohamedali AM, Mufti GJ. 2013. Recent advances in understanding the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*, 162 (5):587-605.
- Mason CC, Khorashad JS, Tantravahi SK, Kelley TW, Zabriskie MS, Yan D, Pomicter AD, Reynolds KR, Eiring AM, Kronenberg Z, Sherman RL, Tyner JW, Dalley BK, Dao KH, Yandell M, Druker BJ, Gotlib J, O'Hare T, Deininger MW. 2015. Age-related mutations and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia*.
- Meggendorfer M, Roller A, Haferlach T, Eder C, Dicker F, Grossmann V, Kohlmann A, Alpermann T, Yoshida K, Ogawa S, Koeffler HP, Kern W, Haferlach C, Schnittger S. 2012. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Blood*, 120 (15):3080-3088.

- Merlevede J, Droin N, Qin T, Meldi K, Yoshida K, Morabito M, Chautard E, Auboeuf D, Fenaux P, Braun T, Itzykson R, de Botton S, Quesnel B, Commes T, Jourdan E, Vainchenker W, Bernard O, Pata-Merci N, Solier S, Gayevskiy V, Dinger ME, Cowley MJ, Selimoglu-Buet D, Meyer V, Artiguenave F, Deleuze JF, Preudhomme C, Stratton MR, Alexandrov LB, Padron E, Ogawa S, Koscielny S, Figueroa M, Solary E. 2016. Mutation allele burden remains unchanged in chronic myelomonocytic leukaemia responding to hypomethylating agents. *Nat Commun*, 7:10767.
- Metzker ML. 2010. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*, 11 (1):31-46.
- Mohamedali A, Gaken J, Twine NA, Ingram W, Westwood N, Lea NC, Hayden J, Donaldson N, Aul C, Gattermann N, Giagounidis A, Germing U, List AF, Mufti GJ. 2007. Prevalence and prognostic significance of allelic imbalance by single-nucleotide polymorphism analysis in low-risk myelodysplastic syndromes. *Blood*, 110 (9):3365-3373.
- Navada SC, Steinmann J, Lubbert M, Silverman LR. 2014. Clinical development of demethylating agents in hematology. *J Clin Invest*, 124 (1):40-46.
- Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tonnissen ER, van der Heijden A, Scheele TN, Vandenberghe P, de Witte T, van der Reijden BA, Jansen JH. 2010. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet*, 42 (8):665-667.
- Perez C, Martinez-Calle N, Martin-Subero JJ, Segura V, Delabesse E, Fernandez-Mercado M, Garate L, Alvarez S, Rifon J, Varea S, Boulton J, Wainscoat JS, Cruz Cigudosa J, Calasanz MJ, Cross NC, Prosper F, Agirre X. 2012. TET2 mutations are associated with specific 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine profiles in patients with chronic myelomonocytic leukemia. *PLoS One*, 7 (2):e31605.
- Rinke J, Schafer V, Schmidt M, Ziermann J, Kohlmann A, Hochhaus A, Ernst T. 2013. Genotyping of 25 leukemia-associated genes in a single work flow by next-generation sequencing technology with low amounts of input template DNA. *Clin Chem*, 59 (8):1238-1250.
- Schmidt M, Rinke J, Schafer V, Schnittger S, Kohlmann A, Obstfelder E, Kunert C, Ziermann J, Winkelmann N, Eigendorff E, Haferlach T, Haferlach C, Hochhaus A, Ernst T. 2014. Molecular-defined clonal evolution in patients with chronic myeloid leukemia independent of the BCR-ABL status. *Leukemia*, 28 (12):2292-2299.
- Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, Stone RM, Nelson D, Powell BL, DeCastro CM, Ellerton J, Larson RA, Schiffer CA, Holland JF. 2002. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol*, 20 (10):2429-2440.

- Smith AE, Mohamedali AM, Kulasekararaj A, Lim Z, Gaken J, Lea NC, Przychodzen B, Mian SA, Nasser EE, Shooter C, Westwood NB, Strupp C, Gattermann N, Maciejewski JP, Germing U, Mufti GJ. 2010. Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value. *Blood*, 116 (19):3923-3932.
- Tefferi A, Vardiman JW. 2009. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*, 361 (19):1872-1885.
- Thol F, Heuser M, Ganser A. 2015. Myelodysplastische Syndrome. *Internist* 2015;56: 364-373.
- Thol F, Friesen I, Damm F, Yun H, Weissinger EM, Krauter J, Wagner K, Chaturvedi A, Sharma A, Wichmann M, Gohring G, Schumann C, Bug G, Ottmann O, Hofmann WK, Schlegelberger B, Heuser M, Ganser A. 2011. Prognostic significance of ASXL1 mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*, 29 (18):2499-2506.
- Treppendahl MB, Kristensen LS, Gronbaek K. 2014. Predicting response to epigenetic therapy. *J Clin Invest*, 124 (1):47-55.
- Walter MJ, Ding L, Shen D, Shao J, Grillot M, McLellan M, Fulton R, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, O'Laughlin M, Kandoth C, Baty J, Westervelt P, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK, Ley TJ, Graubert TA. 2011. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 25 (7):1153-1158.
- Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, Wartman LD, Lamprecht TL, Liu F, Xia J, Kandoth C, Fulton RS, McLellan MD, Dooling DJ, Wallis JW, Chen K, Harris CC, Schmidt HK, Kalicki-Veizer JM, Lu C, Zhang Q, Lin L, O'Laughlin MD, McMichael JF, Delehaunty KD, Fulton LA, Magrini VJ, McGrath SD, Demeter RT, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie TN, Walker JR, Watson MA, Heath SE, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Payton JE, Baty JD, Kulkarni S, Klco JM, Tomasson MH, Westervelt P, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Ding L, Mardis ER, Wilson RK. 2012. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*, 150 (2):264-278.
- Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC, McMichael JF, Schmidt HK, Yellapantula V, Miller CA, Ozenberger BA, Welch JS, Link DC, Walter MJ, Mardis ER, DiPersio JF, Chen F, Wilson RK, Ley TJ, Ding L. 2014. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nat Med*, 20 (12):1472-1478.

8 Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1: WHO-Klassifikation der Myelodysplastischen Syndrome (2008).....	4
Tabelle 2: WHO-Klassifikation myelodysplastisch/myeloproliferative Neoplasien (2008)	7
Tabelle 3: Patientenkohorte: Demographische Kriterien	13
Tabelle 4: Probenauswahl $n=30 \triangleq 10$ MDS- und 5 CMML- Patienten im Therapieverlauf..	14
Tabelle 5: Chemikalien	15
Tabelle 6: Lysepuffer [10x] und PE-Puffer.....	16
Tabelle 7: TAE-Puffer [50x]	16
Tabelle 8: DNA-Ladungspuffer für Gelelektrophorese	16
Tabelle 9: TE-Puffer [1x]	17
Tabelle 10: Kitsysteme	17
Tabelle 11: Geräte	18
Tabelle 12: Genauswahl mit jeweiligen Exonen	24
Tabelle 13: FastStart High Fidelity PCR System Protokoll	25
Tabelle 14: FastStart High Fidelity PCR Zyklen	25
Tabelle 15: GC-rich PCR System Protokoll.....	26
Tabelle 16: GC-rich PCR Zyklen.....	26
Tabelle 17: Median und Mittelwerte der <i>reads</i> von allen $n=30$ NGS	34
Tabelle 18: Median und Mittelwert <i>Coverage</i> der 8 JAK2 V617F Sensitivitätskontrollen....	35
Tabelle 19: Detektierte Mutationen in den Proben ($n=20$) der MDS-Kohorte	37
Tabelle 20: Detektierte Mutationen in den Proben ($n=10$) der CMML-Kohorte	39
Tabelle 21: Mutationskinetik bei der MDS-Kohorte	44
Tabelle 22: Mutationskinetik bei der CMML-Kohorte.....	45
Tabelle 23: Keimbahn-Polymorphismen der MDS- und CMML-Patientenkohorte.....	47
Tabelle 24: Irrelevante SNPs, Mutationen in Intron-Bereichen, stille Mutationen.....	67
Tabelle 25: FastStart Primer.....	81
Tabelle 26: GC-rich Primer	96

9 Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Stufenmodell der Leukämiepathogenese	5
Abbildung 2: Assoziation zwischen zytogenetischen Aberrationen und Genmutationen	6
Abbildung 3: Strukturformel von Azacitidin	9
Abbildung 4: Applikationsschema für 5-Azacitidin	10
Abbildung 5: Fusionsprimer-Komponenten	19
Abbildung 6: Bestimmung einer DNA-Konzentration am NanoDrop®	22
Abbildung 7: „Jena 454 Leukämie Panel“	23
Abbildung 8: Prinzip der Aufreinigung	27
Abbildung 9: Prinzip der emPCR und Generierung von DNA tragenden Beads	28
Abbildung 10: Ablauf der 454 Next- Generation-Sequenzierung	29
Abbildung 11 (a-e): Agarosegelelektrophorese nach Generierung von 232 Amplikons mittels PCR am Beispiel der Probe Nr. 34374189	32
Abbildung 12: <i>Sequencing Coverage</i> für alle n=30 Patientenproben	33
Abbildung 13: Grafische Darstellung der Gene mit einer konstanten Mutationskinetik unter Vidaza®-Therapie	42
Abbildung 14 (a-b): Grafische Darstellung der Mutationsanteile (%) für jedes Gen (27) zu zwei verschiedenen Zeitpunkten für die MDS-Kohorte (a) und für die CMML-Kohorte (b)	46
Abbildung 15: Knochenmarkzytologie vom 10.01.2013; Reg-Nr.:37/13	48
Abbildung 16: Knochenmarkzytologie vom 08.08.2013; Reg-Nr.:646/13	49
Abbildung 17: Knochenmarkzytologie vom 22.04.2013;Reg-Nr.:339/13	50
Abbildung 18: Knochenmarkzytologie vom 14.08.2013; Reg.Nr. 666/13	51
Abbildung 19: Knochenmarkzytologie vom 19.02.2014; Reg.Nr. 136/1	52
Abbildung 20: Knochenmarkzytologie vom 30.09.2014; Reg.Nr. 801/14	53

10 Anhang

10.1 Bekannte Einzelnukleotid-Polymorphismen ohne pathologische Bedeutung

In der folgenden **Tabelle 24** befinden sich alle detektierten Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP, engl. *Single Nucleotide Polymorphism*) und gleichbedeutend kodierende Variationen, die im Ensembl *Browser* als solche beschrieben wurden und von PolyPhen-2 und PROVEAN als benigne oder verträglich eingestuft wurden. Auch diese wurden von der Analyse ausgeschlossen.

Tabelle 24: Identifizierte irrelevante SNPs, Mutationen in Intron-Bereichen, stille Mutationen in den n=30 Patientenproben

Gene	DNA-Variation	Protein Variation	Ensembl <i>Browser</i>	PolyPhen-2 Prognose	PROVEAN Prognose	Probe	Mutationsanteil (%) REPLI-g®
ASXL1	c.1939G>A	p.G647S	SNP (rs3746609)	benigne	verträglich	33379468	21,25
						33880449	4,56
ASXL1	c.2429T>C	p.L810P	SNP (rs6058694)	benigne	verträglich	10-167	99,75
						11-610	100
						11-795	99,73
						12-325	99,73
						33056681	100
						33433770	100
						33433638	100
						33596022	99,77
						33293192	100
						33511940	100
						33697558	100
						34153263	100
						33703452	100
						34098283	100
						13060670	100

Gene	DNA-Variation	Protein Variation	Ensembl <i>Browser</i>	PolyPhen-2 Prognose	PROVEAN Prognose	Probe	Mutations-anteil (%) REPLI-g®
						34191665 13074281 34535644 33917287 13075164 33379468 33880449 33239338 33403660 33935230 34374189 34266380 34478735 34236542 34554713	99,71 100 99,19 99,77 100 100 100 100 100 99,62 100 100 99,78 100 100
ASXL1	c.3744T>C	p.S1248	SNP (rs4911231), Gleichbedeutend			10-167 11-610 11-795 12-325 33293192 33511940 33697558 34153263 13060670 34191665 33917287 13075164 33379468	85,64 100 99,09 100 98,7 98,9 50,1 46,27 42,11 46,7 50,76 54,24 92,4

Gene	DNA-Variation	Protein Variation	Ensembl <i>Browser</i>	PolyPhen-2 Prognose	PROVEAN Prognose	Probe	Mutations-anteil (%) REPLI-g®
						33880449 33935230 34374189 34266380 34478735	93,98 100 99,54 52,21 47,61
CSF3R	c.2115G>A	p.K705	SNP (rs373095416), Gleichbedeutend			13060670 34191665	50,43 56,76
CSF3R	c.2211C>T	p.S737	SNP (rs376211630), Gleichbedeutend			34153263 34098283	41,23 14
DNMT3A	c.27C>T	p.P9	SNP (rs41284843), Gleichbedeutend			13060670 34191665	46,88 35,62
DNMT3A	c.1122+7G>A	n/a	Splice-region Variante (rs2276599)			10-167 11-610 11-795 12-325 33056681 33433770 33433638 33596022 33293192 33511940 33697558 34153263 34098283 13060670 34191665 13074281 34535644	99,5 100 100 100 100 100 99,65 100 99,54 100 99,61 100 70,42 48,73 43,76 99,36 99,58

Gene	DNA-Variation	Protein Variation	Ensembl <i>Browser</i>	PolyPhen-2 Prognose	PROVEAN Prognose	Probe	Mutations-anteil (%) REPLI-g®
						33917287 13075164 33379468 33880449 33239338 33403660 33935230 34374189 34266380 34478735 34236542 34554713	100 99,53 99,38 100 99,27 100 99,47 100 100 100 100 100
DNMT3A	c.1266G>A	p.L422	SNP (rs2276598), Gleichbedeutend			33935230 34374189 34266380 34478735	52,35 44,94 58,66 48,51
ETV_6	c.258G>A	p.T86	SNP (rs11611479), Gleichbedeutend			33433638 33596022 33697558 34153263 34098283 13060670 34191665	48,08 44,74 52,26 45,78 21,14 47,00 48,63
EZH2	c.396T>C	p.P132	SNP (rs61732845), Gleichbedeutend			10-167 11-610	39,19 56,44
EZH2	c.553G>C	p.D185H	SNP (rs2302427)	benigne	schädlich	13060670 34191665 33379468	11,24 10,00 50,48

Gene	DNA-Variation	Protein Variation	Ensembl <i>Browser</i>	PolyPhen-2 Prognose	PROVEAN Prognose	Probe	Mutationsanteil (%) REPLI-g®
						33880449 33935230 34374189	48,87 93,83 93,12
IDH1	c.315C>T	p.G105	Somatische Mutation (COSM253316), SNP (rs11554137), Gleichbedeutend			10-167 11-610 33293192 33511940 34236542 34554713	44.19 52.75 49.43 56.08 47,74 53,31
KRAS	c.87G>A	p.V29	Ø, Gleichbedeutend			33293192	6.64
KRAS	c.182A>G	p.Q61R	Somatische Mutation (COSM552, COSM1158660) SNP (rs121913240)	benigne	verträglich	33935230 34374189	49,78 51,58
NOTCH1	c.4129C>T	p.P1377S	SNP (rs61751542)	benigne	verträglich	33293192 33511940	11.96 49.13
NOTCH1	c.5073G>A	p.Q1691	SNP (rs61751538), Gleichbedeutend			33917287 13075164 33239338 33403660	43,29 49,35 45,61 43,77
NOTCH1	c.5094C>T	p.D1698	Somatische Mutation (COSM33747, COSM1461158), SNP (rs10521), Gleichbedeutend			33056681 33433770 33703452 34098283 13074281 34535644	54.70 48.34 47.89 27.33 99,58 100,00

Gene	DNA-Variation	Protein Variation	Ensembl <i>Browser</i>	PolyPhen-2 Prognose	PROVEAN Prognose	Probe	Mutations-anteil (%) REPLI-g®
						33917287 13075164 33379468 33880449 33239338 33403660 33935230 34374189 34266380 34478735 34236542 34554713	100,00 100,00 51,59 48,45 50,29 44,50 52,41 49,85 52,65 42,53 58,11 49,16
NOTCH1	c.5718G>A	p.A1906	SNP (rs369730620), Gleichbedeutend			33293192 33511940	41.01 48.15
NOTCH1	c.6555C>T	p.D2185	SNP (rs2229974), Gleichbedeutend			33056681 33433770 33433638 33596022 33293192 33511940 33697558 34153263 33703452 34098283 13074281 34535644 33917287 13075164	54.92 56.58 49.68 49.68 96.64 100.00 99.47 100.00 99.42 74.32 100 100 100 100

Gene	DNA-Variation	Protein Variation	Ensembl <i>Browser</i>	PolyPhen-2 Prognose	PROVEAN Prognose	Probe	Mutations-anteil (%) REPLI-g®
						33379468 33880449 33239338 33403660 33935230 34374189 34266380 34478735 34236542 34554713	50,90 55,65 100,00 98,49 48,89 49,14 53,63 45,78 100,00 100,00
NOTCH1	c.7606G>A	p.V2536I	Somatische Mutation (COSM33847), SNP (rs111627256)	benigne	verträglich	13074281 34535644	49,28 46,24
NPM1	c.875A>G	p.K292R	∅	benigne	neutral	33433638 34098283	97,38 21,32
p53	c.108G>A	p.P36	SNP (rs1800370), Gleichbedeutend			33433638 33596022 34098283 34236542 34554713	43,53 33,55 15,55 51,83 51,96
p53	c. 215C>G	p.P72R	Somatische Mutation (COSM250061), SNP (rs1042522)	benigne	verträglich	10-167 11-795 12-325 33056681 33433770 33433638 33596022 33293192	8,55 51,99 60,45 16,55 41,04 51,44 62,83 52,48

Gene	DNA-Variation	Protein Variation	Ensembl <i>Browser</i>	PolyPhen-2 Prognose	PROVEAN Prognose	Probe	Mutations-anteil (%) REPLI-g®
						33511940 33697558 34153263 33703452 34098283 13060670 34191665 13074281 34535644 33917287 13075164 33379468 33880449 33403660 33935230 34374189 34266380 34478735 34236542 34554713	65,32 51,62 45,09 97,78 85,06 56,64 52,5 99,36 99,52 99,55 99,47 51,04 48,12 2,69 54,6 50,38 52,97 57,65 49,09 46,41
SRSF2	c.144C>T	p.D48	SNP (rs237057), Gleichbedeutend			10-167 11-610 11-795 12-325 33056681 33433770 33433638 33596022	100 100 53,49 47,58 100 100 66,49 50,95

Gene	DNA-Variation	Protein Variation	Ensembl <i>Browser</i>	PolyPhen-2 Prognose	PROVEAN Prognose	Probe	Mutations-anteil (%) REPLI-g®
						33293192	98,24
						33511940	100
						33697558	99,57
						34153263	100
						33703452	100
						34098283	74,23
						13060670	100
						34191665	100
						13074281	99,87
						34535644	100
						33917287	99,67
						13075164	100
						33379468	99,73
						33880449	100
						33239338	99,69
						33403660	100
						33935230	100
						34374189	100
						34266380	52,03
						34478735	48,79
						34236542	100
						34554713	99,61
SRSF2	c.402T>C	p.S134	SNP (rs237058), Gleichbedeutend			10-167	99,56
						11-610	100
						11-795	100
						12-325	100
						33056681	100
						33433770	100

Gene	DNA-Variation	Protein Variation	Ensembl <i>Browser</i>	PolyPhen-2 Prognose	PROVEAN Prognose	Probe	Mutations-anteil (%) REPLI-g®
						33433638 33596022 33293192 33511940 33697558 34153263 33703452 34098283 13060670 34191665 13074281 34535644 33917287 13075164 33379468 33880449 33239338 33403660 33935230 34374189 34266380 34478735 34236542 34554713	60,24 42,09 100 100 99,53 100 100 70,83 100 100 100 100 100 100 100 99,34 100 100 100 100 100 100 100 100 99,46
STAG2	c.450A>G	p.E150	Gleichbedeutend			34098283	7,30
TET2	c.86C>G	p.P29R	SNP (rs12498609)	vielleicht schädlich	schädlich	34236542 34554713	94,47 94,89

Gene	DNA-Variation	Protein Variation	Ensembl <i>Browser</i>	PolyPhen-2 Prognose	PROVEAN Prognose	Probe	Mutations-anteil (%) REPLI-g®
TET2	c.100C>T	p.L34F	SNP (rs111948941)	benigne	schädlich	33433638 33596022 34098283	2.39 51.56 18.62
TET2	c.521C>A	p.P174H	SNP (rs146031219)	benigne	verträglich	13060670 34191665	48,12 47,40
TET2	c.652G>A	p.V218M	SNP (rs6843141)	benigne	verträglich	33433638 33596022	39.42 46.58
TET2	c.1064G>A	p.G355D	SNP (rs61744960)	vielleicht schädlich	schädlich	10-167	3,01
TET2	c.1088C>T	p.P363L	SNP (rs17253672)	benigne	schädlich	33056681 33433770 33433638 33293192 33697558 34153263 33703452 34098283	56.76 46.73 3.23 4.17 46.10 46.45 7.03 9.90
TET2	c.3251A>C	p.Q1084P	SNP (rs75056899)	benigne	verträglich	33917287 13075164	41,08 53,31
TET2	c.4884T>C	p.Y1628	Ø, Gleichbedeutend			33433638	10.53
TET2	c.5162T>G	p.L1721W	SNP (rs34402524)	vielleicht schädlich	schädlich	10-167 11-795 12-325 33056681 33433770 33433638	22.91 55.28 50.00 62,93 47,13 4,1

Gene	DNA-Variation	Protein Variation	Ensembl <i>Browser</i>	PolyPhen-2 Prognose	PROVEAN Prognose	Probe	Mutationsanteil (%) REPLI-g®
						33293192 33511940 33697558 34153263 33703452 34098283	54,49 45,53 48,76 59,19 53,5 25,24
TET2	c.5284A>G	p.I1762V	SNP (rs2454206)	benigne	verträglich	10-167 11-610 11-795 12-325 33056681 33433770 33433638 13060670 34191665 33917287 13075164 33379468 33880449 34266380 34478735	44,86 50,24 42,86 48,14 36,39 50,2 3,69 47,33 48,15 48,07 47,31 47,27 44,33 49,30 45,80
TET2	c.5333A>G	p.H1778R	SNP (rs62621450)	vielleicht schädlich	schädlich	33433638 33596022 34098283	40.38 40.84 18.14
UTX	c.2177C>A	p.T726K	SNP (rs2230018)	benigne	verträglich	11-795 12-325 33433638	94.04 94.51 37.01

Gene	DNA-Variation	Protein Variation	Ensembl <i>Browser</i>	PolyPhen-2 Prognose	PROVEAN Prognose	Probe	Mutations-anteil (%) REPLI-g®
						33596022 33293192 34098283 33917287 13075164	54.13 4.96 22.22 98,92 100,00
UTX	c.3111G>A	p.Q1037	Somatische Mutation (COSM1179848), SNP (rs20539), Gleichbedeutend			10-167 33433638 33596022 33697558 34153263 34098283 13074281 34535644	12.35 35.18 35.28 44.01 52.71 16.77 100,00 99,39
WT1	c.1107A>G	p.R369	Somatische Mutation (COSM1353507, COSM1353508) SNP (rs16754), Gleichbedeutend			33697558 34153263 33703452 34098283 33917287 13075164	11.03 35.41 28.43 20.69 38,80 36,69
ZRSR2	c.864C>T	p.N288	SNP (rs2301724), Gleichbedeutend			10-167 11-610 33056681 33433770 33433638 33596022 33697558 34153263 34098283	91.79 100.00 35.84 48.09 95.88 99.49 51.91 44.90 58.19

Gene	DNA-Variation	Protein Variation	Ensembl <i>Browser</i>	PolyPhen-2 Prognose	PROVEAN Prognose	Probe	Mutationsanteil (%) REPLI-g®
						13060670 34191665 33379468 33880449	53,99 60,28 100 100,00
ZRSR2	c.1333_1338dupAGCCGG	p.S447_R448dup	∅		neutral	10-167	38.53
ZRSR2	c.1338_1343dupGAGCCG	p.S447_R448dup	∅		neutral	11-610 33433638 33596022 33697558 34153263 34098283	34.83 41.54 43.03 45.65 42.00 20.20

REPLI-g® = REPLI-g® DNA oder auch *whole genome amplified DNA*, ∅ = nicht bezeichnet

10.2 Primerliste

Tabelle 25: FastStart Primer

Primer	Primersequenz	Produktgröße	Amplikonpoolrate
ASXL1_12_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGTC CCTAGGTCAGATCACCC	344	1,5x
ASXL1_12_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCACC ATCACCACTGCTGC		
ASXL1_12_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATGA GGGAGGTGGCAGAG	346	1x
ASXL1_12_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACTG AGGTTTGGGAGGACAG		
ASXL1_12_3F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGGA GATGCCTCCCAACTC	350	1x
ASXL1_12_3R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGTTT TGCAGGCAATCAGTC		
ASXL1_12_4F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATGA GGAGCAAGGACCCAC	341	1x
ASXL1_12_4R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGGTT TGGGCTGTTTCACTAC		
ASXL1_12_5F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGAAA ACTTGAAAACCAAGGCTC	338	1x
ASXL1_12_5R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAG GACTCAGTGCTTCAGAG		
ASXL1_12_6F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCACT CTGGACTGTGCCATC	384	1x
ASXL1_12_6R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGTA CTGGCCAGCAGTAGGG		
ASXL1_12_7F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAAG GTGAATGGTGACATGC	325	1x
ASXL1_12_7R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTAAA GATCCCATGCGTAGCG		
ASXL1_12_8F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACCA GCCACGATGACAG	372	1x
ASXL1_12_8R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGGA CTTCCTTCTGATCTTCAC		
ASXL1_12_9F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAAG GCAGTCCCAAGTTTTG	331	1x
ASXL1_12_9R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAAGG GTTGCAGCCACATTC		
ASXL1_12_10F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTTGGT CCAGAGCAGACAGG	302	1x
ASXL1_12_10R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGCA TTGCCTTAAGAGGAC		
ASXL1_12_11F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGCAG CGTCAAGAATGAGAAG	323	1x
ASXL1_12_11R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCACC ACACTTCCAGCAAGG		
ASXL1_12_12F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGC ATCAAGCAGGCATTT	350	1x
ASXL1_12_12R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAAT GTTTCCCATGGCCATA		
BRAF_11F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAGG GGATCTCTTCCTGTATCC	344	1x

Primer	Primersequenz	Produktgröße	Amplikonpoolrate
BRAF_11R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGTTT ATTGATGCGAACAGTGA		
BRAF_15F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCTT GCTCTGATAGGAAAAATG	300	1x
BRAF_15R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGATT TTTGTGAATACTGGGAAC		
CALR_9F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAGG CCCTGAGGTGTGTG	367	1x
CALR_9R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAACC AAAATCCACCCCAAAT		
CBL_8F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGGA CCCAGACTAGATGCTTTC	387	1,2x
CBL_8R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGCC ACCCCTTGTATCAGTA		
CBL_9F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGGG GTTAGGTTTAAACTTTTACTTT	361	1,2x
CBL_9R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCA CAATGGATTTTGCCAGT		
CSF3R_14F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTATC CTCAGTTCCCCACA	352	1x
CSF3R_14R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGACC AGGGGATTCAAAGTCA		
CSF3R_17_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGG GGCAGACATCTGAAAT	333	1x
CSF3R_17_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGTG GAGTCACAGCGGAGAT		
CSF3R_17_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGACC CAAGAGCAGTTTCAC	392	392
CSF3R_17_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTATG GACCCTCCCTCTTCT		
DNMT3A_10F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCTGT GCCACCCTCACTACT	337	1x
DNMT3A_10R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCCC TAAGCATGGCTTTCC		
DNMT3A_11-12F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGGAG TTTCCTGTCAGCCTGT	366	1x
DNMT3A_11-12R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGAG TCCCAGGCAACAAAC		
DNMT3A_13F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGTCA CAGTGCCTCCCTTTTC	331	1x
DNMT3A_13R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACCC TGTACATGCCCAGAAG		
DNMT3A_14F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGG GCTTAGGCTCTGTGAG	304	1x
DNMT3A_14R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGTC TGTGGGGAAGGGAG		
DNMT3A_15F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCCAT TCCAGGTAGCACACC	318	1x
DNMT3A_15R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCCA CAACCAAGGCTCAG		
DNMT3A_16F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGG GTGTGTGGGTCTAGGA	319	1x
DNMT3A_16R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAAGC TTCCCTTTGGGATAA		

Primer	Primersequenz	Produktgröße	Amplikonpoolrate
DNMT3A_17F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGACTT GGGCCTACAGCTGAC	321	1x
DNMT3A_17R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCTCC AGGTGCTGAGTGTG		
DNMT3A_18F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAAC TTGGTCCCGTTCTTGT	360	1x
DNMT3A_18R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCAG GGCAGAAATATCCAAG		
DNMT3A_19F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATTCC CGATGACCCTGTCTT	339	1x
DNMT3A_19R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGCTC CACAATGCAGATGAGA		
DNMT3A_20F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGC TTGTGGAATGTGGCTA	333	1x
DNMT3A_20R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCACT ATGGGTCATCCCACT		
DNMT3A_21F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGC AGTGTGTGTTTCGTGTG	315	1x
DNMT3A_21R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCAT CCTGCCCTTCCTTCT		
DNMT3A_22F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCAC TCAGAGCCATACCC	372	1x
DNMT3A_22R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGG ACGTTTGTGGAAAACA		
DNMT3A_23F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCCTG CTGTGTGGTTAGACG	373	1x
DNMT3A_23R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGCC TCTGTGGTTTTGTGTT		
DNMT3A_3F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGGTG GGGGCATATTACACAG	349	1x
DNMT3A_3R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCCCT GCAGGACATACATCA		
DNMT3A_4F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAAC AGGCTAAGCCCACTGA	399	1x
DNMT3A_4R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGCC AAGTCCCTGACTCTCA		
DNMT3A_5F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGAAC AGCTAAACGGCCAGAG	309	1x
DNMT3A_5R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCACTT CCTCTCCTTCCCACA		
DNMT3A_6F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCATTG TGTTTGAGGCGAGTG	381	1x
DNMT3A_6R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGCTG AAGGAGCAGATGAACC		
DNMT3A_7F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGTCCC CTTGAGTGTCAGGTG	353	3x
DNMT3A_7R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGAGG AGCTGGCAGTGGAAG		
DNMT3A_8F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGCCTC GTGACCACTGTGTAA	307	1x
DNMT3A_8R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCACTT CCATCACCCCAATTC		
DNMT3A_9F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCCT CTTGCATCGGGTAA	335	1x

Primer	Primersequenz	Produkt- größe	Amplikon- poolrate
DNMT3A_9R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACCT GCACTCCAACCTCCAG		
ETV6_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCAA GGCTAGGCATCTGAAA	358	1x
ETV6_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAA TCCTCTGTCCCTCTCG		
ETV6_3F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCCA GCTGTCTAACTGACAAGAC	301	1x
ETV6_3R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGAGG GGTGTTAAAGACCAACC		
ETV6_4F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTTTCA AGTGCTGCATTCTGTG	347	1x
ETV6_4R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTTGT CTAAACCTCAGGCAAGA		
ETV6_5_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGAGT TTCCTGTCCTGCCAAC	393	1x
ETV6_5_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCA CGCGTGTGCTCTCC		
ETV6_5_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAACC ACCAGGAGTCCTACCC	391	1x
ETV6_5_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGGG AGAGTGGGACTTTGTG		
ETV6_6F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTAGG CAGAAGCAGTTGCTGG	317	1x
ETV6_6R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGAT TATCCTCCAATCCAGG		
ETV6_7F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGCAG GTAGCTTCCCAAACCTG	364	1x
ETV6_7R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGCAA TGATTGGCTTTGGGTA		
ETV6_8F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCG GGGTTCACTAGCTCTC	354	1x
ETV6_8R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATTTC TGGGTCGCTTCCTTT		
EZH2_10F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTTCTC TTCCATCAAAATGAGTTTTCAG	360	1x
EZH2_10R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCCTC ACAACACGAACCTTCAC		
EZH2_11F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGAGT TGTCTCATCTTTTCGC	362	1x
EZH2_11R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCAA GAATTTTCTTTGTTTGGAC		
EZH2_12F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTAGG GACAGCGATGTGTGTT	319	1x
EZH2_12R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCAA CAACAGCCCTTAGGAA		
EZH2_13F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTTG GCTTTAACGCATTCC	300	1x
EZH2_13R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGTC CTCCATTCAAATTGGT		
EZH2_14F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTTGG GGGTGGGAGAGTATT	341	1x
EZH2_14R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGCAA TTGCATCAAAGCAACA		

Primer	Primersequenz	Produktgröße	Amplikonpoolrate
EZH2_15F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGAGA GTCAGTGAGATGCCAG	371	1x
EZH2_15R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTTGC CCCAGCTAAATCATC		
EZH2_16F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAG CAGCTTTCACGTTGAC	372	1x
EZH2_16R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGGC AATTCATTTCCAATCA		
EZH2_17F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGA CCGAATGGGAAAAGAGA	344	1x
EZH2_17R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCTCC TTCTGGTCACCTCAC		
EZH2_18F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGGC AAACCCTGAAGAACTG	332	1x
EZH2_18R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCACA CTGGTGTCAGTGAGCAT		
EZH2_19F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGGA ACTCCCTTTTCAGTCC	342	1x
EZH2_19R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCAC TAATGCTCATGGCAA		
EZH2_20F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTTCA GCAGGCTTTGTTGTG	330	1x
EZH2_20R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCACTT TGCAGCTGGTGAGAA		
EZH2_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGTTT GCTGCGGATTAAAACA	357	1x
EZH2_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGA TCAAGAACCTAAGCTTCCA		
EZH2_3F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGATTT TTAACCTGCTTTACAGGTGTT	312	1,5x
EZH2_3R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCCT GAGGTCAATGATTTC		
EZH2_4F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTTGG GTAGGCAGCATCTCTT	392	1x
EZH2_4R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGAGT AATACTGCACAGGCCTTAAAA		
EZH2_5F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAAT CTGGAGAACTGGGTAAAGAC	316	1x
EZH2_5R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAT GCCCTATATGCTTCATAAAC		
EZH2_6F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGGC TATGCCTGTTTTGTCC	332	1x
EZH2_6R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAAAA GAGAAAGAAGAACTAAGCCC		
EZH2_7F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGA CTGGCATTCCACAGAC	380	1x
EZH2_7R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAAGT GTAGTGGCTCATCCGC		
EZH2_8F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCATC AAAAGTAACACATGGAAACC	348	1x
EZH2_8R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTGTA ATAAATGATAGCACTCTCCAAG		
EZH2_9F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATGG TTGGAGGAGGAGGAAT	349	1x

Primer	Primersequenz	Produktgröße	Amplikonpoolrate
EZH2_9R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACCT CCACCAAAGTGCAAAG		
FLT3_20F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCCAT CACCGGTACCTCCTA	356	1x
FLT3_20R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGCAG ACTGCTGTGAGGGTTT		
IDH1_4F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCATT TGTCTGAAAAACTTTGCT	366	1x
IDH1_4R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGCAA AATCACATTATTGCCAAC		
IDH2_4F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAATTT TAGGACCCCCGTCTG	325	1,5x
IDH2_4R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTAG GCGAGGAGCTCCAGT		
JAK2_12F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCT CTTTGGAGCAATTCA	351	1x
JAK2_12R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCACA AGGTTGGCATATTTTCA		
JAK2_14F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCTG AAAGTAGGAGAAAGTGCAT	342	1,5x
JAK2_14R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTACA GTGTTTTCAAGTTTCAAAAA		
KIT_17F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGAA CATCATTCAAGGCGTA	331	1x
KIT_17R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCA GGACTGTCAAGCAGAG		
KIT_8F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAAG CCTTTCTGGGTTGGAC	365	1x
KIT_8R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAATT GCAGTCCTTCCCCTCT		
KRAS_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTCT GCAGTCAACTGGAAT	339	1x
KRAS_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGAA TGGTCCTGCACCAGTAA		
KRAS_3Fn	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCA CTGTAATAATCCAGACTGTG	300	1x
KRAS_3Rn	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCA TGGCATTAGCAAAGAC		
MPL_10F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCGA AGTCTGACCCTTTTGT	320	1x
MPL_10R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGCGG TATAGTGGGCGTGTTA		
NPM1_12F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGTCT ATGAAGTGTTGTGGTTCCT	372	1,5x
NPM1_12R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTTTG TCTCCCCACCATTTT		
NRAS_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGGCC GATATTAATCCGGTGT	345	1x
NRAS_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGGG TAAAGATGATCCGACAA		
NRAS_3F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCCTC CCTGCCCCCTTAC	357	1x
NRAS_3R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCCT AGATTCTCAATGTCAAACAA		

Primer	Primersequenz	Produkt- größe	Amplikon- poolrate
RUNX1_4F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCATTG CTATTCCTCTGCAACC	336	1x
RUNX1_4R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCC ATGAAACGTGTTTCAAGC		
RUNX1_5F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATTCC GGGAGTGTGTCAAA	335	1x
RUNX1_5R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGTT GAACCCAAGGAATCTG		
RUNX1_6F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGATC TCTCCCTCCCTCCT	348	1x
RUNX1_6R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGT TGGTCTGGGAAGGTGT		
RUNX1_7BF	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACCCT GGTACATAGGCCACA	369	1x
RUNX1_7BR	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCAA CTCCTTCATGCACCTC		
SETBP1_4F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATGC ACCCACTTTCAACACA	326	1x
SETBP1_4R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTCTC CGCTTGGTCAGAAGT		
SF3B1_12F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGAAA CCACACCTATTACTCTGCTC	393	1x
SF3B1_12R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCTCT TACGGCAAAGATGACA		
SF3B1_13F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTTA AACAGTTCGTCCCTTGA	329	1x
SF3B1_13R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAAGA AAGGACAGTCATGAGTTGG		
SF3B1_14F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTTGAT TATGGAAAGAAATGGTTGA	399	1x
SF3B1_14R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAAGA CCCTGTCTCCTAAAGAAAAA		
SF3B1_15F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCTG ACAGGCTATGGTTCA	332	1x
SF3B1_15R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCAA AAGGTAATTGGTGGATT		
SF3B1_16F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGTATC CGCCAACACAGAGGA	319	1x
SF3B1_16R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGTTA GAACCATGAAACATATCCA		
STAG2_10F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCCC AAAATACTGGGGAAT	370	1,5x
STAG2_10R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGGG AAACACCAAACCTCACA		
STAG2_11F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGGC CCATGCTTCATTCTA	398	1x
STAG2_11R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATAA AGGGGAGGCTTCCAGA		
STAG2_12-13F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTTTTA ATGCATTGTCTCATCTTTT	399	5x
STAG2_12-13R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCTA GATGAGTCTGAACCAAATCTC		
STAG2_14F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGGA CGTTACTAAAAGCACCTGTT	300	1x

Primer	Primersequenz	Produktgröße	Amplikonpoolrate
STAG2_14R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAAAG GAAAAAGTAAAATGTGAAAGC		
STAG2_15F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGCAA TTATTTGCGTGGTGTG	342	1x
STAG2_15R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCCT CATTTTAACCCCTTTT		
STAG2_16F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCTG TTTGAGAGTTTGTAGATGA	356	1x
STAG2_16R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAA AACAAAATATGCACGAAG		
STAG2_17F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGGG ATGCTGAGGGTTTTAG	379	3x
STAG2_17R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTGTT TCATGGCTAAAATGGAA		
STAG2_18-19F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCTA ATGGGCTTAATAAATACAGAA	398	2x
STAG2_18-19R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAA CTGAATAATTTTCTTAAAGGTT		
STAG2_20F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTTTCC ATGGTGGTATGGTCA	341	1x
STAG2_20R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACTG CAGTAGAGGGGCTCAA		
STAG2_21F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCCA GCCATATTGCCTTAAA	340	1x
STAG2_21R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCCA CAACGACAACAACAAA		
STAG2_22-23F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAATT GTCATTAGGCTTAGCTTTTT	398	5x
STAG2_22-23R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGTGT GAGTTTGCTGAAAACAGT		
STAG2_24F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGACA AACCGTCTCTTTGTTTTCA	379	1x
STAG2_24R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAAG ATATTTCTGCTTTGCTCAATC		
STAG2_25F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGGCA GTTAGTGAGAAACCTTGG	354	1x
STAG2_25R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCTGT GTTTCACGTTTTTAAGGA		
STAG2_26F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGTTT TCCCTTTTCAAATTCTCTT	319	1x
STAG2_26R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGCA GCCATGCATAAAAACT		
STAG2_27F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAACA TTCTTTCCTGCCTTTGAA	334	1x
STAG2_27R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTGC ACACTTTGCCCAATTT		
STAG2_28F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCA CTTTTGGTCATTGTCAT	388	1x
STAG2_28R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTCCA AATGAAAGGGCTAGATTT		
STAG2_29F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCA CATTCTCACACTTTACAACC	338	1x
STAG2_29R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTGCC CTTAAGAATCCCAAAA		
STAG2_30F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCCT ATGCTCGCACAACATA	373	1x

Primer	Primersequenz	Produktgröße	Amplikonpoolrate
STAG2_30R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAA CCTTAATGACAATTCAGTTGG		
STAG2_31F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCCTG TGACTTGCAATGTGGA	400	1x
STAG2_31R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGC GTGCTTCAAGGAGAAT		
STAG2_32F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCC ACATACTGCTGCCTAGA	392	1x
STAG2_32R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGAT CTACCACCTTCACCAACC		
STAG2_33F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCCG GCTGATAATTTTCCAT	320	1x
STAG2_33R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGTA TGCTGCCCCAGGTCTT		
STAG2_34F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGAG GGGAAGTTTTCAAAGTGG	309	1x
STAG2_34R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCCC CAATGCACTTGATCT		
STAG2_3F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGCAG TCAAATGCAAGGGAAT	345	1x
STAG2_3R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAATG CATTCCCCATTTTGTG		
STAG2_4F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTTGTG TGTTTGTAACGTGCT	370	1x
STAG2_4R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCACC CCCTTAAAAAGCCATT		
STAG2_5F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGGAC ACCACAAAGAGGCTGT	368	1x
STAG2_5R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACAA ATGAAGTGGGAAGAACAAC		
STAG2_6F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTTGTT TACTGAATTCGATTCTATTTT	344	1,5x
STAG2_6R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTTAG GTGGAACAACGAAGTGA		
STAG2_7F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGAT GGTTGAAGAAGTATGCCTTT	317	2x
STAG2_7R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATTA CAGGCATGAGCCACCA		
STAG2_8F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATG CATTCTAAATGAAATTGCT	386	1x
STAG2_8R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGATG GGGGAGTGTCTCTTAG		
STAG2_9F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGGCC ATTGTGAGGATTAGGA	397	1x
STAG2_9R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCAA GTTGGTCACACAATAGCC		
TET2_10_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAA CTAGGCCACCAACACA	336	1x
TET2_10_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGTTTC CTTTGTGCGCAAGTC		
TET2_10_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCC ATTCAGGTAAGTGTCT	379	1x
TET2_10_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCT GTGCAGCAAATCACCA		
TET2_11_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAAG ATACCTGTTTCTGTTCTCTCTT	315	1x

Primer	Primersequenz	Produkt- größe	Amplikon- poolrate
TET2_11_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGC TTGAGATGAGGTGGAATA		
TET2_11_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCACTT CAGATATCTATGGAAGCAC	349	1x
TET2_11_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATTTT GGTTTCCATAACCTAAGTATT		
TET2_11_3F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGCC AAGGTTTGGAATAGCC	300	1x
TET2_11_3R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGGC ATGAAGAGAGCTGTTG		
TET2_11_4F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTCA CATAATCCATAACTACAGTGC	300	1x
TET2_11_4R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAATG TCAGGATCCAGAAAGCTC		
TET2_11_5F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGCAG AGGACAACGATGAGGT	318	1x
TET2_11_5R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATGG GATTTCTGAGGCACAT		
TET2_11_6F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAGC CAAAATGGCTGAAAAAG	300	1x
TET2_11_6R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTGTG GTCTTTTCAAGTGAGGT		
TET2_3_10F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAAA ATCAAGCGAGTTCGAG	300	1x
TET2_3_10R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGTTGT GACTTCTGCTCCTGTTC		
TET2_3_11F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATAA TGTGATCCCAAAGCAAGA	300	1x
TET2_3_11R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTTGG GGTTGCTGTGTTTG		
TET2_3_12F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCCC AGAAGGACACTCAAAA	362	1x
TET2_3_12R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACTG GCCCTGACATTTCAAC		
TET2_3_13F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCAC CTGCAAGCTGTGATAA	347	1x
TET2_3_13R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAG TCTTGACAGGTGTATCAA		
TET2_3_14F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCCA GCTTTAGAGCAGCAA	354	1x
TET2_3_14R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTTCA CAAGACACAAGCATCG		
TET2_3_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATTCA ACTAGAGGGCAGCCTTG	338	1x
TET2_3_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACTG TGC GTTTTATTCCTCCAT		
TET2_3_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCACA AGAAAGTAGAGGGTATTCC	339	1x
TET2_3_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAATT AGCACTTTTCCCCTCCTG		
TET2_3_3F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCACA TAACTGCAGTGGGCTG	341	1x
TET2_3_3R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGTTA GAGGTCTGTGCGGAATTG		

Primer	Primersequenz	Produktgröße	Amplikonpoolrate
TET2_3_4F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCTGT GAGATCACTCACCCATC	340	1x
TET2_3_4R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTTTG TTTTAAATACCGTTCAGAGC		
TET2_3_6F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGGGA AGTGAAAATAGAGGGTAAAC	349	1x
TET2_3_6R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCTG GTTTCAGATAGTGCTGTG		
TET2_3_7F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGATTC TGAAGGGTCGAGACAAG	340	1x
TET2_3_7R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGG AGATGTTGGTCCACTGTA		
TET2_3_8F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAGG CAAGCTTACACCCAGA	352	1x
TET2_3_8R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGAT GGTTGTGTTGTGCTG		
TET2_3_9F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGCAC TTGAATCAACAGGCTTC	379	1x
TET2_3_9R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCA CTTGATTTTCATGGTCTG		
TET2_4F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCTTA ATGTGTAGTTGGGGGTTA	361	1x
TET2_4R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTGTG ACTCTCTGGTGAATAGCA		
TET2_5F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGTTC ATTTCTCAGGATGTGG	314	1x
TET2_5R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGCA TGAGTCTTTGATCTGG		
TET2_6F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGTG ACCCTTGTTTTGTTTTGG	336	1x
TET2_6R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACCA AAGATTGGGCTTTCCTAT		
TET2_7F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAG CTGCACAGCCTATATAATG	337	1x
TET2_7R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTAC AGTTTGGGAAAACTTTGAT		
TET2_8F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTTGTG TTTGGGATTCAAATGT	331	1x
TET2_8R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCA GTGGTTTCAACAATTAAGA		
TET2_9F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTTCGC ATTCACACACACTTTT	336	1x
TET2_9R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTTGC TCCTCATTTGCCTTC		
TP53_10F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGCTGT ATAGGTACTTGAAGTGCAG	349	1x
TP53_10R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGC CTTTGACCATGAAGG		
TP53_11F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCTTA GGCCCTTCAAAGCAT	362	1x
TP53_11R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCAC AACAAAACACCAAGTGC		
TP53_4F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGA CTGCTCTTTTCAACCA	344	1x

Primer	Primersequenz	Produkt- größe	Amplikon- poolrate
TP53_4R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAA GTCTCATGGAAGCCAG		
TP53_5F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCACTT GTGCCCTGACTTTCA	343	1x
TP53_5R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCACT CGGATAAGATGCTGAGG		
TP53_6F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGA TAGCGATGGTGAGCAG	335	1x
TP53_6R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTGC ACATCTCATGGGGTTA		
TP53_7F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCTGC TTGCCACAGGTCT	331	1x
TP53_7R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGAG TGGGAGCAGTAAGGAGA		
TP53_8F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGGG ACCTCTTAACCTGTGG	351	1x
TP53_8R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTAAC TGCACCCTTGGTCTCC		
TP53_9F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAGC AAGCAGGACAAGAAGC	342	1x
TP53_9R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGGT ATAAGTTGGTGTTCTGAAGTT		
U2AF1_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCTG CTGACATATTCCATGT	324	1x
U2AF1_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGTC GATCACCTGCCTCACT		
U2AF1_6F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATTA AAGCGTGGATGGCAAG	324	1,5x
U2AF1_6R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCTG GAAATGGGCTTCAAA		
UTX_10F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTTGGT TTGTTTTCTGCTTCG	354	1x
UTX_10R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTTTC AGGAATCTTGGTTAATAATG		
UTX_11F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGGTTT GTTGGAGGGCAAAT	351	1,5x
UTX_11R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGTG ATGCAACCATCTTTGT		
UTX_12F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCAA GCAGTTCTTCTGAGTTGA	326	1x
UTX_12R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCTG AGTGTTCTGGGGAAAT		
UTX_13F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGGTTT ATATTCCGGTTACCCTGT	334	1x
UTX_13R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGCA CCTGCAGAACATAACC		
UTX_14F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGCCTT TTGGGTGGCTTATT	374	1x
UTX_14R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTGTT TGCTACCTCTACTCCTTTT		
UTX_15F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCATT TCAGGGAAAGGTTGC	356	2x
UTX_15R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTA AAAATCTCCGTCAATTACCA		

Primer	Primersequenz	Produktgröße	Amplikonpoolrate
UTX_16_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGAAT CCCCTATAGATTCTCTTCCC	314	1x
UTX_16_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGTG TCTGTACTTCCCAGCG		
UTX_16_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGTG CCTAGCGTCTCTCAGC	378	1x
UTX_16_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACCA GTTCCCCAAACACTTC		
UTX_17_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGAT AACTTTAGGACTTGGGTCAA	384	1x
UTX_17_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTTCC TGAAGGCTTGCTCTC		
UTX_17_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACCTC AGGTGGACAACAAGG	366	1x
UTX_17_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCT GTTGAAATGGCTGAAG		
UTX_17_3F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCCAC CCAGCTGTTCATACA	369	1x
UTX_17_3R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGGT CCAAATTTACAGCATTC		
UTX_18F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCACA TTCATGGACTTGTGC	351	2x
UTX_18R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAATG TTTCCTAAAGGGCATCC		
UTX_19F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGGAG AAATGTATGTGGTTACTATCTG	376	1x
UTX_19R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTGC CAGTGCTGGAAG		
UTX_20F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCC GTAAAATGCTTTACCTTC	381	1x
UTX_20R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGTGT CCTTTCAAACTCCAAAG		
UTX_21-22F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGGA AAGGATTGCCAGTTGT	338	1x
UTX_21-22R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAATT CCCAATCTAGCACAGGA		
UTX_23F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTTTTT CTGATTGGAACACAAGG	332	1x
UTX_23R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAAAT GACAAGATTCTGGCTGTC		
UTX_24F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGTTT CCAAAGACCCATTTTC	336	1x
UTX_24R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGGC AATGTATCCATTAGGAGA		
UTX_25F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTTTGT GACATTTTCTTCCAGTCTT	393	1x
UTX_25R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAAT TCTATGCAAGGAGTCATTCTT		
UTX_26F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACCT GAGCAGGTGATAATGG	318	1,2x
UTX_26R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTGCT TTGATGTCAACGTAATTC		
UTX_27F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACAA ATAATTTCTCCCCACAA	300	1x

Primer	Primersequenz	Produktgröße	Amplikonpoolrate
UTX_27R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGGC TAAGCAACAAAATTGAA		
UTX_28F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGTC CACAATTTCAATTCAAGTAG	334	1x
UTX_28R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGAG CAAACACTGCTGCTTC		
UTX_29F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTTAG GAAGATTGGCTGAATGG	333	1x
UTX_29R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGGA AGGTTGCATAGACACAG		
UTX_3F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCAT TATCTTGGGGAGGAA	382	1x
UTX_3R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGAAC ATGCAGGTGGTTTTCA		
UTX_4F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGGTG TGGTGGGAATCTTGT	323	1x
UTX_4R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGAG AGTCATACAAGACAGCACA		
UTX_5F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAG GGCTGGAATACCTCTC	330	1x
UTX_5R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAAG CACAAACAAAACAAGCA		
UTX_6F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAGA ATTCATGCACGTGTAAAAA	329	1x
UTX_6R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTGAT AAACAGTTCTGTCACCTGAA		
UTX_7F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCCA CAGCATGTCAGTTGTC	376	1x
UTX_7R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTAGC CATGGCAACCAATACA		
UTX_8F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGACT GTGATAATGTTTGATGCTTTG	333	1x
UTX_8R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGC AAGCACTCCTTGGA		
UTX_9F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGAT GTAAAGAAACATTCAATAATGG	329	1x
UTX_9R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCAC ATATTTGCCACACTCG		
WT1_7F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGACC TACGTGAATGTTACATG	349	1x
WT1_7R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACAA CACCTGGATCAGACCT		
WT1_9F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCA GACATTGCAGGCATGGCAGG	349	1x
WT1_9R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGCAC TATTCCTTCTCTCAACTGAG		
ZRSR2_10F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTTTGG GAGCTTGACCATTTT	347	1x
ZRSR2_10R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATAC TGGGTTTCCCCCAAAG		
ZRSR2_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGTGC CCGTCTCGACTCTTAG	363	1x
ZRSR2_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGCCA TCTATCATCGCCTCAT		

Primer	Primersequenz	Produkt- größe	Amplikon- poolrate
ZRSR2_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCCTC AGCACCCGAACCTATT	323	1x
ZRSR2_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTACTT GGGGGCAGAAGTCAC		
ZRSR2_3F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGCCA CCCCTATTGTCCTTTT	352	1x
ZRSR2_3R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGACT GGTACTGGTTAGTAAAGGTTGA		
ZRSR2_4F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTTTGC TCTCGTGTGTGTGTG	330	1x
ZRSR2_4R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGAGA TGGAGTTCCGCTCTTG		
ZRSR2_5F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGTGC GCTGTATGTGAAATG	330	1x
ZRSR2_5R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGACC CGAAGAAGAGCATCAG		
ZRSR2_6F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAA AAGATCTGTGATTCAAAAGAA	385	1x
ZRSR2_6R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCACA GGGGTCATGAATACCA		
ZRSR2_7F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGGAG CCAAGAGAGACATGGA	379	1x
ZRSR2_7R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGGA ACTCAAAAACGTCAGC		
ZRSR2_8F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCAC CATGCCTGGTCTAAAG	375	1x
ZRSR2_8R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGTGT CCCAGCTCTCTTGTG		
ZRSR2_9F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGGGA ATGTTAGCCTGGACAA	340	1x
ZRSR2_9R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGAAC ACGCCATTGCACTCTA		

Tabelle 26: GC-rich Primer

Primer	Primersequenz	Produkt- größe	Amplikon- poolrate
DNMT3A_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGATCCT CTTCTCTCCCCACA	370	1,2x
DNMT3A_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGCG GTCATGCACTCAGTAT		
ETV6_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGGGA GAGGAAAGGAAAGTGG	355	1,5x
ETV6_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAATT GTGACCGGCATTTTCAT		
LNK_2_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGGTG TGTAATGGGGCCTACA	379	1,5x
LNK_2_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCTGT GTCCCGGTAGTCG		
LNK_2_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGC AGTTCACCGACCTCTT	365	3x
LNK_2_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCC AGGGCAGGAACTTCT		
LNK_2_3F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGGA GAGGCTGCTGAGAC	398	2.5x
LNK_2_3R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTTGC ACTCGGCCTAAAAGTT		
NOTCH1_25_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGAC ACCGTCCTGTCTTCC	368	1x
NOTCH1_25_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGCT CGCACGCCTCCT		
NOTCH1_25_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAAA TTCAACGGGCTCTTGT	365	1x
NOTCH1_25_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTCCC TCAGCCCCATGA		
NOTCH1_26_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGCCA GCATGCAGTTCTAAGG	331	1x
NOTCH1_26_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGCA GGAAGTGAAGGAG		
NOTCH1_26_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGGT GGTGGTGGTGCTG	341	1x
NOTCH1_26_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGAGA GTTGCGGGGATTGAC		
NOTCH1_27F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGA CTGTGGCGTCATGG	359	1x
NOTCH1_27R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACAC CCGTGGGTAGCAACT		
NOTCH1_28F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGTAG CCGCTGCCTGATGTC	343	1x
NOTCH1_28R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGAC TCCCGGTGAGGATGC		
NOTCH1_29F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGAGC TCGCTCAGCCTCAC	355	2x
NOTCH1_29R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGT CGGCGTCAACCTCAC		
NOTCH1_30F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGCCCT GACAGGCTCTGC	334	2x

Primer	Primersequenz	Produktgröße	Amplikonpoolrate
NOTCH1_30R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACAC CCCAAGGATGAAAGC		
NOTCH1_31F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGCCCT CCAGACTGAGCAC	364	1x
NOTCH1_31R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGCA GGTGGGCACACAG		
NOTCH1_32F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGTCC AGGCGTTCGTTCTG	347	1x
NOTCH1_32R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGACTT GCCTGCGTGAAAGAAG		
NOTCH1_33F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCGT AGATGACCTGGGTGAG	338	1x
NOTCH1_33R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGAG ACCCTGTGGGTCAG		
NOTCH1_34_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGACTG CTGCTTCCTCTGGTGA	358	1x
NOTCH1_34_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTTG AGGCTGCCCAGGTA		
NOTCH1_34_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGGC TGCTGGACGAGTACAA	357	1x
NOTCH1_34_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCACG GACGGAGACTGCTG		
NOTCH1_34_3F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCAT GGCTACCTGTCAGACG	351	1x
NOTCH1_34_3R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTATTG GTTTCGGCACCATGC		
NOTCH1_34_4F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGAAT GGTCAATGCGAGTGG	359	1x
NOTCH1_34_4R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCTGA GCTCACGCCAAGGT		
NOTCH1_34_5F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTGCA GCCACAAAACCTTACAGA	333	1x
NOTCH1_34_5R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGTCC ACAGGCGAGGAGTAG		
NOTCH1_34_6F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGCC ATCCTCGCTGGT	335	1x
NOTCH1_34_6R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATCC ACAGAGCGCACACA		
RUNX1_3F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGCTGT TTGCAGGGTCCTAA	340	1x
RUNX1_3R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCCTGT CCTCCCACCACCCTC		
RUNX1_8_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCGCA ACCTCCTACTCACTTCCG	333	1x
RUNX1_8_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATGG AGAACTGGTAGGAGCC		
RUNX1_8_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGGTTCC AAGCCAGCTCGCCC	341	1x
RUNX1_8_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGGGC TTGTGCGGAACAGGAGG		
SRSF2_1_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAAGG CAACTGCCTGAGAGG	315	1,5x
SRSF2_1_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATGG CATCCATAGCGTCCT		

Primer	Primersequenz	Produkt- größe	Amplikon- poolrate
SRSF2_1_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCCTCC CTCAAGGTGGACAA	398	2x
SRSF2_1_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCGCG GACCTTTGTGAGGT		
SRSF2_2F	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCGG ATTCCCAGACATTACC		
SRSF2_2R	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTGG AATTAACCCCGCTGT	370	1x
TET2_3_5F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAATTC TGTTCAAGTTCCAGCAG	346	1x
TET2_3_5R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGATGG ATTAGGACTCTGGGAAGG		
TP53_2-3F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTCAG ACACTGGCATGGTGT	366	1x
TP53_2-3R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGCAGC CCAACCCTTGTCCT		
UTX_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGTAAA GTTGGTGTGCTGGTCC	317	1,5x
UTX_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGAGA GCGGCTACTGCCC		
UTX_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCTCG GTTTGCGCTCTTC	367	1,5x
UTX_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGAAA AGAGCGATTTGCAAG		
ZRSR2_11_1F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGAGTG CTGTTTCATCACTGTGC	379	1x
ZRSR2_11_1R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGGCGG TCCCTATTTCTTCCTC		
ZRSR2_11_2F	CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAGCAGG GGGAAGAAATCTCACA	329	1x
ZRSR2_11_2R	CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAGAACC CATCTGCGTTCATAGC		

10.3 Urkunde IZKF-Promotionsstipendium



Universitätsklinikum
Jena



Urkunde

Das Interdisziplinäre Zentrum für Klinische Forschung (IZKF)
an der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität
Jena

vergibt das

IZKF-Promotionsstipendium

an

Frau Johanna Speith

für die Durchführung einer Promotionsarbeit zum Thema:

„Klonale Evolution beim myelodysplastischen Syndrom (MDS) unter epigenetischer Therapie mit Azacytidin“

Jena, den 11. November 2014

Prof. Dr. O. W. Witte
Vorsitzender des IZKF

Prof. Dr. K. Benndorf
Dekan der Medizinischen Fakultät

10.4 Danksagung

Danksagung

Diese Arbeit ist in der Abteilung für Hämatologie und Internistische Onkologie, Klinik für Innere Medizin II am Universitätsklinikum Jena entstanden. Ich danke daher Herrn Prof. Dr. med. A. Hochhaus für die Möglichkeit der Promotion.

Die Anregung zu diesem Thema kam von Herrn PD Dr. med. T. Ernst. Ihm danke ich nicht nur für seine hervorragende fachliche Leitung, sondern darüber hinaus auch für seine freundliche Betreuung und Unterstützung. Er war mir stets ein verständnisvoller Ansprechpartner für alle Fragen.

Zudem bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors. Besonders hervorheben möchte ich hier die Arbeitsgruppe Ernst v.a. V. Schäfer, J. Rinke, A. Waldau und E. Obstfelder für ihre Geduld bei der Einführung in die Laborarbeiten. Später unterstützten sie mich mit vielen praktischen Ratschlägen und halfen bereitwillig und tatkräftig, wenn sich Probleme ergaben. Die herzliche Atmosphäre an der Pipettierbank werde ich nicht vergessen. Danke auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens, die ich sehr zu schätzen weiß.

Nennen möchte ich auch alle, die mir während des Studiums unermüdlich zur Seite gestanden und mich begleitet haben. Dazu gehören insbesondere meine Familie, gute Freunde und vor allem Bastian Matt, der mich so häufig an kleine Arbeitspausen erinnern musste und mich stets ermutigte durchzuhalten.

Am Wichtigsten aber ist mir, meinen Eltern dafür zu danken, dass sie stets an mich glauben. Dieser vorbehaltlose Rückhalt hat mir unendlich viel Mut und Durchhaltevermögen geschenkt. Danke, dass ihr immer für mich da seid.



10.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. med. A. Hochhaus, PD. Dr. med. habil. T. Ernst, V. Schäfer, J. Rinke und Anja Waldau,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, 26.01.2017

Johanna Speith

10.6 Präsentation

Vortrag in der Abstract-Kategorie: MDS, Epigenetik

Johanna Speith, Jenny Rinke, Vivien Schäfer, Anja Gawlitza, Anja Waldau, Andreas Hochhaus, Thomas Ernst

Good response to epigenetic treatment with azacitidine in patients with myelodysplastic syndroms and chronic myelomonocytic leukemia is associated with clonal stabilization

Gemeinsame Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Onkologie, Leipzig, 2016